

UC-NRLF



B 3 789 159

2 CENTRALBLATT

für

Bakteriologie, Parasitenkunde und Infektionskrankheiten.

Erste Abteilung. L. Band.

Originale.

ZENTRALBLATT
für
Bakteriologie, Parasitenkunde
und Infektionskrankheiten.

In Verbindung mit

Geh. Med.-Rat Professor Dr. Loeffler
in Greifswald,

Geh. Med.-Rat Professor Dr. R. Pfeiffer
in Breslau
und

Geh. Reg.-Rat Professor Dr. M. Braun
in Königsberg

herausgegeben von

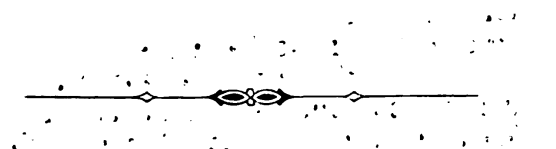
Prof. Dr. Oscar Uhlworm in Berlin.

Erste Abteilung. L. Band.

Medizinisch-hygienische Bakteriologie und tierische Parasitenkunde.

Originale.

Mit 12 Tafeln und 58 Abbildungen im Texte.



J e n a,
Verlag von Gustav Fischer.
1909.

THE
UNIVERSITY OF CALIFORNIA

Centralbl. f. Bakt. etc. I. Abt. Originale. Bd. L. Heft 1.

Nachdruck verboten.

Some preliminary studies on the growth of the typhoid and the colon bacillus on media containing blood and carbo-hydrates.

By **Dr. Eugene P. Bernstein,**

Second Assistant Pathologist, Pathological Laboratory, Mt. Sinai Hospital, New York.

In October, 1906¹⁾, Dr. Epstein and I published a simple method of preparing blood media for routine laboratory work. It was our intention to study together the features of the growth of various organisms on various media containing blood. Dr. Epstein being prevented by hospital duties from taking part in the further work, I continued the work myself and found some remarkable differences in the growth of the colon bacillus and the typhoid bacillus on agar media containing blood and various carbo-hydrates²⁾. Our method of preparing the blood for the media I will append to this article.

In my investigations I used agar containing one per cent of the various carbo-hydrates and to each 15 c. c. of agar I added 1 c. c. of the sterilized ox blood. The blood used had been preserved five months in the ice-box. Altogether sixteen carbo-hydrates were tested and very interesting results were obtained by means of surface inoculations.

On lactose-blood-agar the typhoid colonies failed to produce hemolysis, whereas the colon colonies did. On raffinose-blood-agar the appearance of the colonies was distinctly different, the typhoid colonies appearing umbilicated with radiating lines from the center to the periphery. The colon colonies failed to show these peculiarities.

On maltose-blood-agar the typhoid colonies were of a deeply pigmented, almost black appearance while the colon colonies were of a dull white color. On five per cent glycerine-blood-agar the same difference in pigmentation of the colonies was observed. The most remarkable differences were found with the use of dextrin-blood-agar. The typhoid colonies caused a precipitation in this medium and were black in color, while the colon colonies caused hemolysis and were white in color.

The late appearance of the above changes (3—5 days being sometimes necessary) lessens the practical application of these results, but with further experimentation it is possible that they may be made available for an early diagnosis. It may be found feasible to combine the dextrin-blood-agar with methods calculated to interfere with the growth of other bacteria. Studies will soon be carried on in the laboratory to determine what other organisms are possessed with the power of producing black colonies on carbohydrate blood media, but the phenomena already observed was so striking that it was considered advisable to make them generally known. The method of sterilizing the blood as advocated in the paper by Dr. Epstein and myself has been slightly modified being at present as follows:

1) Journ. of Infectious Diseases. Vol. III. p. 772.

2) Some of these observations I presented at the meeting of the New York Pathological Society. October 1906.

Four hundred c. c. of beef blood are drawn directly into a sterile Erlenmeyer flask of 500 c. c. capacity containing 35 c. c. of a one per cent solution of ammonium oxalate (in distilled water). The flask is then shaken for one or two minutes. On its arrival in the laboratory one-half c. c. of formalin of 40 volume strength is added and the flask is allowed to stand undisturbed for one hour. The blood is then transferred in small quantities into sterile Erlenmeyer flasks and diluted with twice its volume of sterile (0,9 per cent) saline solution. This dilution reduces the actual formalin content to one part in 2,400 of blood. The diluted blood is allowed to stand for twenty-four to forty-eight hours at room temperature before employing it for cultural purposes so as to allow of a better diffusion of the formalin. It is then ready for use. The blood at this stage must receive the same care as any other sterile nutrient medium. The flasks are sealed and kept on ice. After some time (10—12 weeks) the blood begins to assume a darker color and is then useless for observing the finer hemolytic changes produced by bacterial growths. But its usefulness for cultural purposes remains unimpaired and it is on the medium made up with the older blood that the changes between the growth of the typhoid and the colon bacillus are particularly well seen.

As it will be seen, the only change we have made from our former method lies in the fact that we add 35 c. c. of a one per cent solution of ammonium oxalate instead of 30 c. c., and that the formalin is added at the laboratory instead of sending it down to the slaughter house in the flask.

In the preparation of the media we use the diluted blood in the proportion of one part to fifteen of agar or broth of various kinds. This quantity of blood we have found to be the optimum for showing changes of blood color and hemolysis. The ordinary laboratory organisms all grow very well on these blood media.

It is necessary to state that an occasional beef will give the blood which is of a deep crimson color, such blood will not be selected for the work as lacking interferes with the study of hemolysis.

Nachdruck verboten.

Zur kulturellen Unterscheidung zweier Pseudotuberkulosebacillen (*Bacillus Pfeiffer* und *Bacillo opale agliaceo Vincenzi*) der Nagetiere.

Von Dr. **Livio Vincenzi**,

o. Professor für allgemeine Pathologie an der Universität Sassari.

Mit 1 Tafel und 2 Figuren im Text.

Der von mir im Jahre 1890 (1) beschriebene „*Bacillo opale agliaceo*“ der Pseudotuberkulose ist wegen des bläulichen Farbtones der auf Gelatine gewachsenen Kolonien und des starken Knoblauchgeruches der bei Zimmertemperatur gehaltenen Kulturen leicht von dem Pfeifferschen (2) *Bacillus* zu unterscheiden.

Wer aber die ziemlich reiche Literatur über die Pseudotuberkulose

der Nagetiere durchgeht, wird nie oder fast nie den von mir isolierten Bacillus erwähnt finden.

Solches Stillschweigen bedeutet vielleicht, daß meine Arbeit wenig bekannt ist, oder daß alle diejenigen, welche über die Pseudotuberkulose der Nagetiere geschrieben haben, den Unterschied zwischen den beiden Bacillen nicht anerkennen?

Diese zweite Hypothese scheint mir die wahrscheinlichere zu sein; darum will ich noch einiges über die kulturellen Eigenschaften der Pseudotuberkulosebacillen hinzufügen, um zu beweisen, wie dieselben zu unterscheiden sind.

Beide zeigen sich als kurze Stäbchen mit abgerundeten Enden, mit ausgesprochener Neigung, Kettenverbände zu bilden, unbeweglich, ohne Sporenbildung, fakultativ anaërob. Beide wachsen auf allen gewöhnlichen Nährböden schnell und üppig und bei sehr niedrigen Temperaturen.

Mein Bacillus gedeiht schon bei 0° C, wie ich vor einigen Jahren im Institut für Hygiene und Bakteriologie der Universität in Straßburg (Prof. Dr. Forster) konstatiert habe, während der Pfeiffersche Bacillus meiner Erfahrung nach eine minimale Temperatur von 5° C zum Wachsen braucht.

Die auf der Oberfläche der Gelatineplatte gewachsenen Kolonien unterscheiden sich folgendermaßen: Die Kolonien des *Bacillo opale agliaceo* sind den Kolonien des *Bacterium coli* sehr ähnlich, nur etwas heller und mit bläulichem Farbenton (Fig. 1).

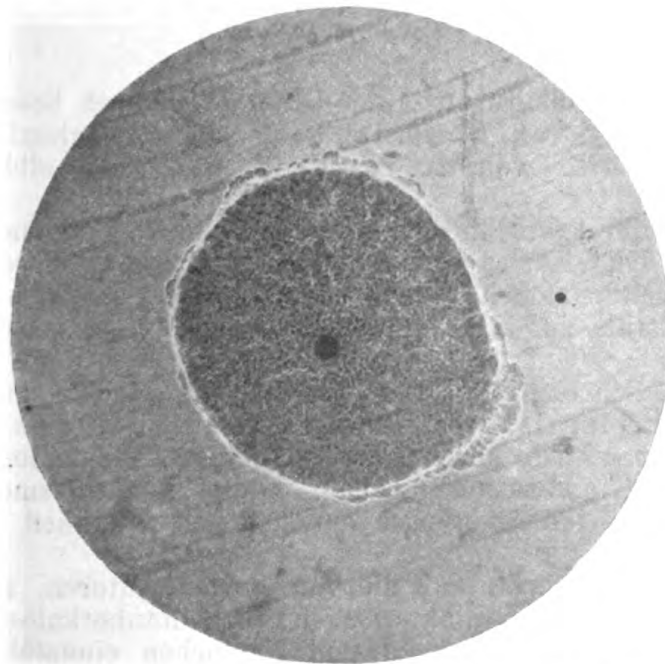


Fig. 1. Kolonie des „*Bacillo opale agliaceo*“ auf der Oberfläche von gewöhnlicher Gelatine, 5 Tage alt.

Die Kolonien des Pfeifferschen Bacillus sind blaßgelb gefärbt und zeigen nach dem Autor „eine Marmorierung, wie man sie häufig auf Blechwaaren sieht, deren Zinnüberzug durch Einwirkung einer Säure eine kristallinische, eisblumenähnliche Zeichnung angenommen hat“. Ich gebe in Fig. 2 eine solche Kolonie wieder.

Die Kolonien meines Bacillus erscheinen feucht, glänzend; diejenigen des Pfeifferschen Bacillus matt, trocken.

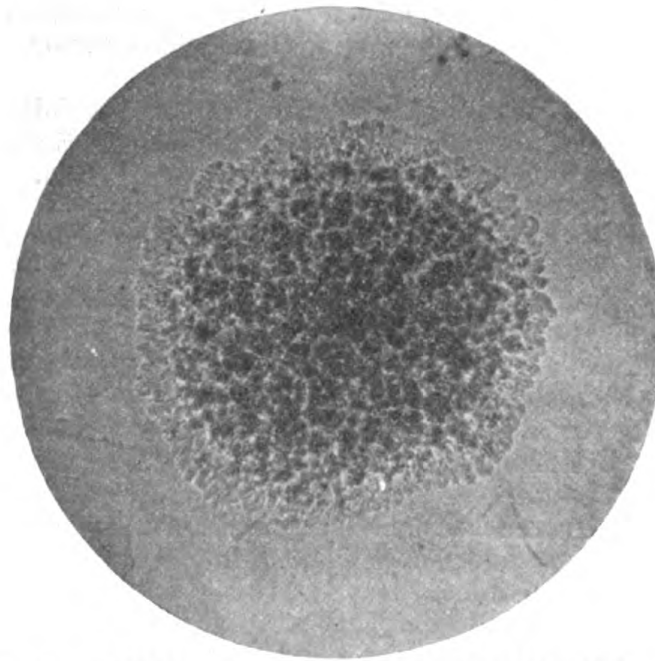


Fig. 2. Kolonie des Pfeifferschen Bacillus auf der Oberfläche von gewöhnlicher Gelatine, 5 Tage alt.

¶ In Gelatinestrichkultur tritt der Unterschied noch bedeutend besser hervor. Der Belag von *B. agliaceo* ist dünn, opaleszierend, feucht (Fig. 3), der Belag von *B. Pfeiffer* dick, weißgelblich, trocken (Fig. 4).

Gelatine- und Agarkulturen meines Bacillus (bei Zimmertemperatur) werden nach Knoblauch; die Kulturen des Pfeifferschen Bacillus haben einen unangenehmen Geruch, jedoch ganz verschieden vom vorigen.

Das Wachstum auf allen anderen Nährböden zeigt keinen besonderen Unterschied.

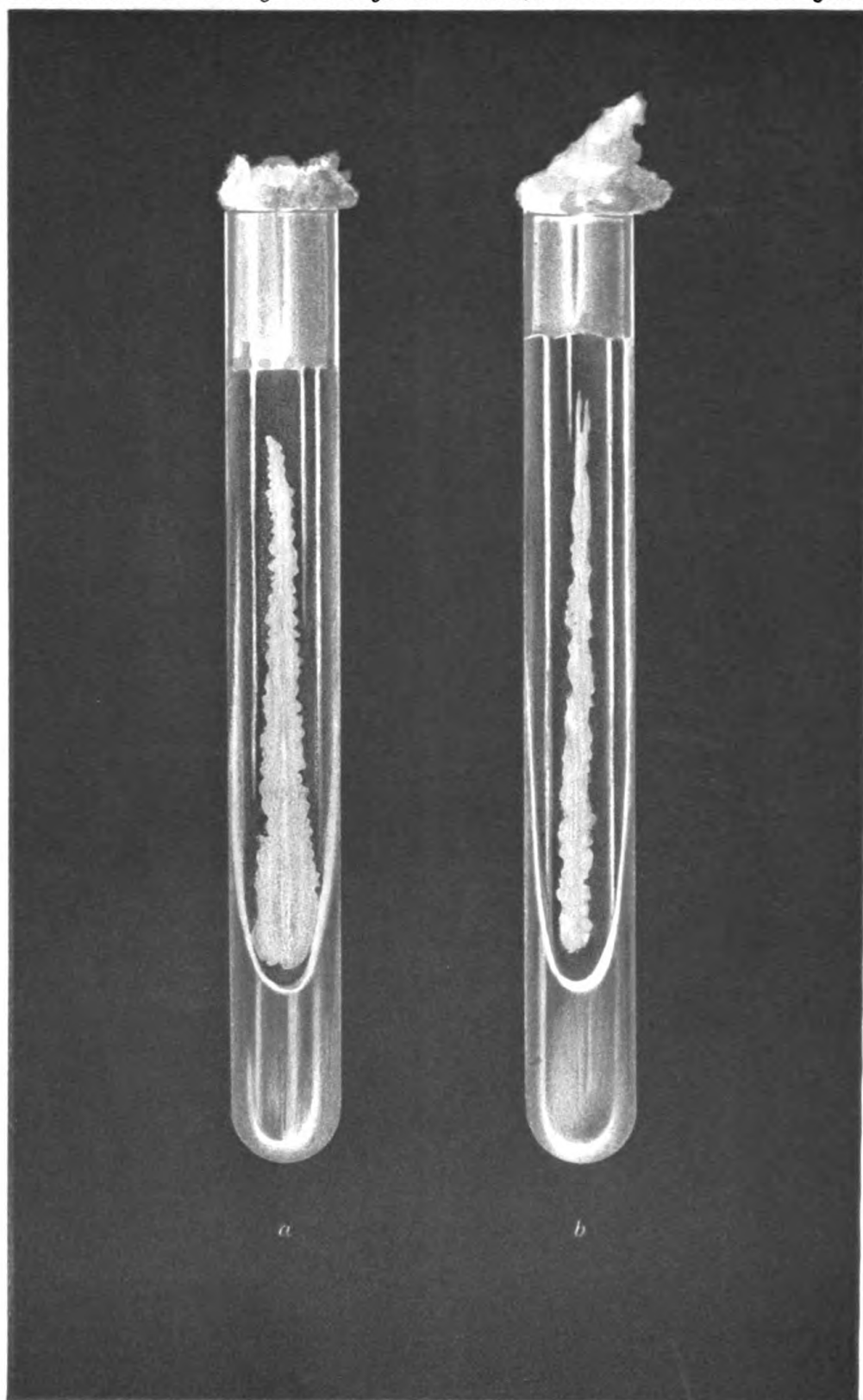
Beide Bacillen sind besonders für Meerschweinchen und Kaninchen pathogen. Der *B. agliaceo* besitzt im Vergleich zu dem anderen eine höhere Virulenz. Beide sind, per os eingeführt, imstande, die Pseudotuberkulose der Tiere zu verursachen. Dieser Infektionsmodus muß als der gewöhnliche bei der natürlich entstandenen Krankheit der Nagetiere angesehen werden.

Es sei hier bemerkt, daß die von einigen Autoren, z. B. Sacerdotti (3), beschriebenen Bakterien der Pseudotuberkulose, welche, in den Magen der Meerschweinchen und Kaninchen eingeführt, nicht die Fähigkeit besitzen, die Krankheit hervorzurufen, mit dem Pfeifferschen und mit meinem Bacillus nichts zu tun haben.

Sassari, 18. Dezember 1908.

Literatur.

- 1) Vincenzi, Ricerche sperimentali con un nuovo bacillo patogeno (*Bacillo opale agliaceo*) e considerazioni sulla così della pseudotubercolosi zoologica. (Giorn. della R. Accademia di medicina Torino. 1890. No. 6.)



Vincenzi gez.

Verlag von Gustav Fischer in Jena.

Lith Anst v Johannes Arndt, Jena

- 2) Pfeiffer, A., Ueber die bacilläre Pseudotuberkulose bei Nagetieren. Leipzig (Thieme) 1889.
- 3) Ricerche sopra un bacillo del gruppo „B. pseudotuberculosis (A. Pfeiffer)“. (Arch. scienze mediche. Vol. XXIX. 1905.)

Tafelerklärung.

Fig. 3. Strichkultur auf Gelatine vom „Bacillo opale agliaceo“.

Fig. 4. Strichkultur auf Gelatine vom Pfeifferschen Bacillus.

Nachdruck verboten.

Beitrag zur Biologie des Rotlaufbacillus.

Von **Walther Stickdorn**, prakt. Tierarzt.

Von der Beobachtung ausgehend, daß zuweilen im Laboratoriumsversuch gegen solche Rotlaufkulturen, die frisch aus Organen zwar schutzgeimpfter, jedoch nach einigen Monaten an natürlichem Rotlauf verendeter Schweine isoliert sind, Sera nicht schützen, die den zu ihrer Herstellung verwandten Stämmen gegenüber höchst wirksam sind, daß aber mit der Zeit nach entsprechender Behandlung dieser Kulturen sich auch gegen sie Schutz erzielen läßt, stellte mir der Leiter des Bakteriologischen und Serum-Institutes zu Landsberg a. W., Herr Dr. Schreiber, die Aufgabe, zu untersuchen, inwiefern Rotlaufstämme von der genannten Eigenschaft künstlich durch Laboratoriumsbehandlung verändert werden können, und ob dabei nur Virulenz- oder aber auch Stammesunterschiede eine Rolle spielen.

Diese Frage ist von praktischer Bedeutung: Zunächst werden diese Umstände bei der Wertbemessung eines herauszugebenden Serums von Wichtigkeit sein. Ein mit solchen, nach der einen oder der anderen Seite hin veränderten Stämmen hergestelltes Serum wird ebenfalls Unterschiede gegen Sera aufweisen, die mit originalen, aus dem erkrankten Tier direkt gewonnenen Stämmen bereitet sind; andererseits werden sich die von den Instituten in Verkehr gebrachten Kulturen je nach der Behandlung verschieden verhalten. Ferner wird bei der großen Anpassungsfähigkeit des Rotlaufbacillus an bestimmte biologische Verhältnisse der Schluß nicht ungerechtfertigt sein, daß wie im Laboratoriumsversuch, so auch bei der natürlichen Infektion die Entstehung von Virulenz- oder von Stammesunterschieden möglich ist.

Meine Untersuchungen erstrecken sich

- A. auf Veränderungen der Virulenz,
- B. auf Veränderungen der Stammeseigentümlichkeiten, bezw. Entstehung von Stammesunterschieden des Rotlaufbacillus.

A. Virulenzveränderungen.

Es ist bekannt, daß nicht alle in der Natur vorkommenden Rotlaufstämme die gleiche Virulenz besitzen. Schreiber (1) weist auf die starken Reaktionen hin, die bei den im Institut zur Immunisierung verwandten Pferden durch bestimmte Stämme ausgelöst werden, und schließt daraus auf eine stellenweise Aenderung der Pathogenität des Rotlaufbacillus. Aus diesem Grunde halte in bestimmten Gegenden die durch die Impfkulturen erzeugte aktive Immunität gegenüber der Infektion mit dem dort vorkommenden Rotlaufbacillus nicht vor. — Nach

den Untersuchungen von Olt (2) und Bauermeister (3), die durch Jensen (4), Pitt (5), van Velzen (6) u. a. bestätigt wurden, spielen Virulenzveränderungen bei der natürlichen Infektion eine große Rolle. Man fand nämlich, daß der Rotlaufbacillus im Darm und in den Tonsillen ganz gesunder Schweine fast regelmäßig saprophytisch vegetiert. Ob es zur Erkrankung komme, sei abhängig von der Virulenz der Bakterien, die unter bestimmten Bedingungen zum Schaden des Wirtes gesteigert und entfaltet werden könne.

Ferner führt Preisz (7) die zuweilen ungünstigen Ergebnisse der Lorenzschen Impfung auf die „sehr verschiedene Virulenz“ der angewandten Kulturen zurück. — Nach Prettners (8) Untersuchungen unterliegt die Virulenz des Rotlaufbacillus großen Schwankungen. Es gebe Stämme, welche erst in der zehnfach größeren Menge Mäuse töten als andere.

Ich prüfte zunächst die Virulenzveränderungen, die der Rotlaufbacillus durch andauernde Passage durch Nährböden erleidet, dann sein Verhalten nach und bei längerer Hindurchschickung durch Tierkörper.

Zu meinen Untersuchungen benutzte ich einen Rotlaufstamm, der aus der Milz eines Ende April 1908 an perakutem Rotlauf gefallenen, einige Monate vorher schutzgeimpften Schweines isoliert worden war. In dem betreffenden Bestande ist der Rotlauf nach Angabe des Tierarztes Dr. N. in J. stationär, der durch die Impfung erzielte Schutz halte dort nur kurze Zeit vor.

Die mikroskopische und kulturelle Prüfung des benutzten Rotlaufstammes — nach den in den Institutsprotokollen gemachten Angaben nenne ich ihn R 15 — ergab folgendes: Feine Stäbchen, färbbar nach Gram und mit Anilinfarben. Stichkulturen in Gelatine zeigen das charakteristische Gläserbürstenwachstum. [Das von Lorenz (10) bei hochvirulenten Stämmen beobachtete kugelige Wachstum der Kolonien in Gelatine trifft für den von mir bearbeiteten Stamm also nicht zu.] Bouillon wird leicht wölkchenartig getrübt, am Boden des Röhrchens bilden sich zopfähnliche, gedrehte Fäden. In Plattenkulturen entstehen blaugraue Trübungen, auf Agar feine, durchsichtige, Tautröpfchen ähnliche Beläge. Auf Kartoffel ist kein Wachstum zu beobachten. — Graue und weiße Mäuse, Tauben und Sperlinge, die mit den üblichen Dosen infiziert werden, sterben nach 2—4 Tagen.

Die Virulenz der gewonnenen Kulturen wurde im Institut zunächst an dem gewöhnlichen, zur Rotlaufschutzimpfung verwandten Serum geprüft:

Tabelle I.
(Frühere Virulenzprüfung, den Institutsprotokollen entnommen.)

Datum	Impftiere	Serumdosis in ccm	Kulturdosis in ccm	Resultat
30. Mai 1908	2 w. Mse.	0,0066 sk.	0,01 sk.	} † 3—4
dgl.	dgl.	0,01 „	0,01 „	
dgl.	dgl.	0,015 „	0,01 „	
30. Mai 1908	2 w. Mse.	—	0,01 sk.	a) † 1 $\frac{3}{4}$, b) † 2 $\frac{1}{4}$

Anmerkung: Die in den Tabellen gebrauchten Abkürzungen bedeuten:
 gr. Ms. = graue Hausmaus, sk. = subkutan,
 w. Mse. = weiße Mäuse, ip. = intraperitoneal,
 Kn. = Kaninchen, † x = tot x Tage nach der Infektion.

Schon diese Prüfung ließ die Annahme berechtigt erscheinen, daß es sich im vorliegenden Falle um einen sehr virulenten Stamm handle.

Dafür spricht der schnelle Infektionsverlauf bei den Kontrollen und der Umstand, daß das Serum den Eintritt des Todes bei den Mäusen nicht verhindern, sondern nur um 1—2 Tage hinausschieben konnte, während es gegen den zu seiner Herstellung benutzten Stamm hinreichend Schutz gewährte, wie die Vergleichstabelle Ia zeigt:

Tabelle Ia.

Datum	Impftiere	Serumdosis in ccm	Kulturdosis in ccm	Resultat
26. Mai 1908	2 w. Mse.	0,0066 sk.	0,01 sk.	a) + 4, b) + 7
dgl.	dgl.	0,01 „	0,01 „	a) + 5, b) + 8
dgl.	dgl.	0,015 „	0,01 „	leben
26. Mai 1908	2 w. Mse.	—	0,01 sk.	a) + 2 $\frac{1}{2}$, b) + 2 $\frac{1}{4}$

ch wiederholte diese Prüfungen und hatte dasselbe Ergebnis:

Tabelle II.
(Ausgangsstamm R 15.)

Datum	Impftiere	Serumdosis in ccm	Kulturdosis in ccm	Resultat
3. Sept. 1908	2 gr. Mse.	0,0066 sk.	0,01 sk.	a) + 2 $\frac{1}{2}$, b) 3
dgl.	dgl.	0,01 „	0,01 „	a) + 2 $\frac{1}{2}$, b) + 2 $\frac{1}{2}$
dgl.	dgl.	0,015 „	0,01 „	a) + 2 $\frac{1}{2}$, b) + 3 $\frac{1}{2}$
3. Sept. 1908	2 gr. Mse.	—	0,01 sk.	a) + 2, b) + 2

Während also das Serum gegen den zu seiner Herstellung benutzten Stamm in den Dosen 0,0066 und 0,01 eine beträchtliche Verlängerung des Krankheitsverlaufes bewirkte, in der Dosis 0,015 aber sicher schützte, starben nach Infektion mit R 15 die Mäuse ohne Ausnahme in 2 bis 3 $\frac{1}{2}$ Tagen in so unregelmäßigen Abständen, daß daraus ein Schluß auf irgendwelchen Schutz an den Laboratoriumstieren nicht gezogen werden konnte.

Ich suchte nun zunächst die Dosis letalis minima festzustellen, indem ich grauen Mäusen von ca. 15 g Gewicht in immer kleiner werdenden Dosen 2-tägige Bouillonkulturen subkutan applizierte.

Tabelle III.
(Virulenzprüfungen vor der Passage.)

Datum	Impftiere	Impfdosis in ccm	Resultat
10. Sept. 1908	2 gr. Mse.	0,001	a) + 1 $\frac{3}{4}$, b) + 1 $\frac{3}{4}$
dgl.	dgl.	0,000001	a) + 2 $\frac{1}{2}$, b) + 3
dgl.	dgl.	0,0000001	a) + 3 $\frac{1}{4}$, b) + 4
dgl.	dgl.	0,00000001	leben
dgl.	dgl.	0,000000001	leben

Die kleinste eben noch tödliche Dosis für den benutzten Ursprungsstamm lag also bei 0,0000001 ccm.

Ich schritt nun zunächst zur Untersuchung des Ausgangsstammes R 15 bei Passagen durch Nährböden.

I. Nährbödenpassage.

Nach Friedberger (9) tritt selbst bei Verwendung von Nährböden, die in ihrer Zusammensetzung den Substraten am meisten entsprechen, auf denen pathogene Bakterien ihr natürliches Fortkommen

finden, auch bei häufiger Ueberimpfung, durch die eine Erschöpfung des Nährbodens oder die Bildung schädlicher Stoffwechselprodukte ausgeschlossen ist, doch mit der Zeit eine Virulenzabnahme ein. Friedberger erklärt dies mit einer allmählichen Anpassung der ursprünglich parasitisch veranlagten Bakterien an die saprophytische Lebensweise. So soll z. B. für den Diphtheriebacillus oder für Rotz eine längere künstliche Züchtung auf Nährböden die Kulturen ihrer krankheits-erregenden Fähigkeit berauben.

Nach Lorenz (10) kann sich der Rotlaufbacillus je nach dem Nährboden nicht unerheblich an Virulenz verändern, so daß er seine Pathogenität für Mäuse und Tauben vollständig einbüßt.

Als Nährböden benutzte ich abwechselnd Agar und Bouillon. Diese wurde hergestellt, indem eine bestimmte Menge Pferdefleisch zerkleinert, im Verhältnis 1:3 mit Wasser versetzt und mazeriert wurde. Nach Zusatz von 0,2 Proz. Pepton wurde das Gemisch dann gekocht und filtriert, danach nochmals sterilisiert. Der Schrägagar wurde ebenfalls unter Zusatz von 1 Proz. Pepton und 0,5 Proz. NaCl bereitet.

Das Umstechen von Agar auf Bouillon und umgekehrt geschah fast regelmäßig in Intervallen von 2 Tagen, 38mal in einer Zeit von 80 Tagen. Die Kulturen zeigten auf Agar wie in Bouillon immer das typische Wachstum des Rotlaufbacillus. Eine nach dem 22. Umstechen vorgenommene Virulenzprüfung der Nährbödenpassagen ergab folgendes:

Tabelle IV.
(Virulenzprüfungen während der Nährbödenpassage.)

Datum	Impftiere	Kulturdosis in ccm	Resultat
3. Nov. 1908	2 gr. Mse.	0,0001 sk.	a) + 2½, b) + 2½
dgl.	dgl.	0,000001 „	a) + 3½, b) + 4
dgl.	dgl.	0,0000001 „	leben

Während also vor der Passage 0,0000001 ccm graue Mäuse in 3—4 Tagen töteten, genügt diese Dosis schon nach 4 Wochen nicht mehr, wohl aber 0,000001 ccm. Bis zum Ende der Passage vermindert sich die Virulenz noch weiter, wie Tabelle V zeigt. Ich nenne den durch Nährbödenpassage erhaltenen Stamm im folgenden RN.

Tabelle V.
(Virulenzprüfungen nach der Nährbödenpassage.)

Datum	Impftiere	Kulturdosis in ccm	Resultat
25. Nov. 1908	2 gr. Mse.	0,0000001 sk.	leben
dgl.	dgl.	0,000001 „	„
3. Dez. 1908	dgl.	0,00001 „	„
dgl.	dgl.	0,0001 „	a) + 3¾, b) + 4

Die Dosis letalis minima liegt nunmehr erst bei 0,0001 ccm. Die Virulenzabnahme scheint also nicht direkt proportional der Züchtungsdauer, sondern einem Vielfachen derselben vor sich zu gehen, so daß es bei der immer größer werdenden Virulenzverminderung nach Lorenz (l. c.) wohl möglich sein würde, den Rotlaufbacillus bald ganz seiner Virulenz zu berauben.

In der Tat kam es während der im 2. Teil meiner Arbeit niedergelegten Versuche in kurzer Zeit dahin, daß trotz häufigen Umstechens (alle 1—2 Tage) von Bouillon auf Bouillon der benutzte Stamm, RN,

seine Virulenz vollständig einbüßte. Obwohl die Kulturen auf Agar, Gelatine und in Bouillon das üppigste Wachstum zeigten, konnten schließlich selbst Dosen von 0,1 und 0,5 ccm eine graue Maus nicht mehr töten.

Bei Haltung auf nur einem Nährboden (Bouillon) unter optimalen Bedingungen scheint also die Anpassung an die saprophytische Lebensweise (Friedberger l. c.) noch schneller vor sich zu gehen, als bei Umstechen auf zwei verschiedenen Substraten (Bouillon und Agar).

II. Tierpassagen.

Die Veränderungen, die der Rotlaufbacillus durch Tierpassagen erfährt, sind zuerst von Pasteur (11) untersucht worden. Er fand, daß durch Kaninchenpassage die Virulenz des Rotlaufbacillus abgeschwächt, durch Taubenpassage jedoch gesteigert wird, und baute auf dieser Tatsache seine Schutzimpfungsmethode auf.

Prettners (12) Prüfungen ergaben, daß die Virulenz des Rotlaufbacillus durch Taubenpassage für Schweine und Mäuse gesteigert, durch Mäuse- und Kaninchenpassage für Schweine verringert wird. Ferner werde die Virulenz für Mäuse durch ihren eigenen Körper abgeschwächt, die für Tauben ebenso beibehalten.

Zur Passage verwandte ich wieder den Stamm R 15 und ließ ihn durch weiße Mäuse und Tauben gehen.

a) Mäusepassage.

Nachdem die Virulenz des Ausgangsstammes an grauen Mäusen festgestellt war (cf. Tabelle III), schickte ich ihn 17mal hintereinander durch weiße Mäuse. Diese wurden jedesmal mit derselben Dosis, die einem Vielfachen der Dosis letalis minima entsprach, nämlich 0,01 ccm Kultur, infiziert, und zwar intraperitoneal. Nach dem Tode des Versuchstieres wurde jedesmal durch den Sektionsbefund (Obstipatio, Conjunctivitis, Milztumor, parenchymatöse Degeneration von Leber, Herz, Nieren) und durch mikroskopische Untersuchung von Milzpulpausstrichen das Vorhandensein einer Mischinfektion oder anderer Todesursachen als Rotlauf ausgeschlossen. Dann wurde aus dem Herzblute eine neue

Tabelle VI.
(Mäusepassage.)

Lfd. No.	Datum	Dosis	Resultat
1	11. Sept. 1908	0,01	a) + 1 $\frac{1}{4}$, b) + 2
2	15. " "	0,01	a) + 2, b) + 2 $\frac{1}{2}$
3	19. " "	0,01	a) + 2, b) + 2 $\frac{1}{2}$
4	23. " "	0,01	a) + 2 $\frac{1}{2}$, b) + 3
5	28. " "	0,01	a) + 2, b) + 3
6	3. Okt. "	0,01	a) + 2 $\frac{1}{2}$, b) + 3 $\frac{1}{4}$
7	8. " "	0,01	a) + 1 $\frac{1}{4}$, b) + 2
8	12. " "	0,01	a) + 2, b) + 2
9	16. " "	0,01	a) + 2, b) + 2
10	21. " "	0,01	a) + 2, b) + 2 $\frac{1}{4}$
11	26. " "	0,01	a) + 2 $\frac{1}{4}$, b) + 3 $\frac{1}{4}$
12	2. Nov. "	0,01	a) + 3 $\frac{1}{4}$, b) + 3 $\frac{1}{4}$
13	8. " "	0,01	a) + 2 $\frac{1}{4}$, b) + 2 $\frac{1}{4}$
14	15. " "	0,01	a) + 2 $\frac{1}{4}$, b) + 2 $\frac{1}{4}$
15	22. " "	0,01	a) + 1 $\frac{1}{4}$, b) + 2 $\frac{1}{2}$
16	29. " "	0,01	a) + 2, b) + 2 $\frac{1}{4}$
17	6. Dez. "	0,01	a) + 2, b) + 2 $\frac{1}{2}$

Bouillonkultur angelegt und diese nach 2-tägiger Aufbewahrung im Brutschrank bei 36° an das nächste Tier weiterverimpft. Zuweilen wurden die verwandten und auf ihre Reinheit untersuchten Kulturen nochmals von Bouillon auf Bouillon umgestochen.

Aus Tabelle VI läßt sich weder eine Abnahme, noch eine Zunahme der Virulenz folgern. Der verhältnismäßig kurze Verlauf der Infektion von $1\frac{3}{4}$ —2 Tagen findet sich wie bei den ersten, so auch bei den letzten Passagetieren. Der Umstand, daß einige Mäuse erst nach 3 und $3\frac{1}{2}$ Tagen starben, läßt sich nur durch eine gewisse individuelle Disposition der betreffenden Tiere erklären. Jedenfalls läßt Tabelle VI nicht eine derartige Virulenzabnahme erkennen, wie sie Prettners (l. c.) Versuche ergaben. Prettner fand nämlich, daß bei Mäusepassagen des Rotlaufbacillus die Mäuse bis zur 4. Generation binnen $2\frac{1}{2}$ Tagen, während der 5.—7. nach 3—4, nach 9—10 Generationen erst in 4—5 Tagen starben.

Mit dem aus der Mäusepassage gewonnenen Stamm, den ich mit RMs bezeichnen werde, stellte ich — wie oben mit RN — zwei Virulenzprüfungen an: eine nach der 12., eine andere nach der 17. Ueberimpfung.

Tabelle VII.
(Virulenzprüfung von RMs während der Passage.)

Datum	Impftiere	Dosis in ccm	Resultat
8. Nov. 1908	2 gr. Mse.	0,001	a) + $1\frac{3}{4}$, b) + $2\frac{1}{4}$
dgl.	dgl.	0,000001	a) + $3\frac{1}{2}$, b) + $3\frac{3}{4}$
dgl.	dgl.	0,0000001	leben

Im Vergleich zu Tabelle III zeigt sich eine geringe Abnahme der Virulenz. Die Dosis letalis minima ist von 0,0000001 auf 0,000001 ccm gestiegen. Die Prüfung von RMs nach der Beendigung der Passage ist in Tabelle VIII niedergelegt.

Tabelle VIII.
(Virulenzprüfung von RMs nach der Passage.)

Datum	Impftiere	Dosis in ccm	Resultat
3. Dez. 1908	2 gr. Mse.	0,00001	a) + $3\frac{1}{4}$, b) + 4
dgl.	dgl.	0,000001	+ $4\frac{1}{2}$
9. Dez. 1908	dgl.	0,0000001	leben
dgl.	dgl.	0,00000001	„

Die kleinste tödliche Dosis hat sich also auf 0,000001 ccm gehalten. Im ganzen ergibt sich demnach eine geringe Abnahme der Virulenz des Rotlaufbacillus durch Mäusepassage, nicht so sehr für die weißen, als für die grauen Mäuse.

b) Taubenpassage.

Nach Prettners (l. c.) Angaben verhalten sich Tauben der Rotlaufinfektion gegenüber sehr verschieden. Nach seinen und Kitts Untersuchungen bleibt zwar die Virulenz für Tauben durch Taubenpassage erhalten und wird in der gleichen Weise für Mäuse gesteigert, jedoch zeigen sich die Tiere sehr verschieden empfänglich, je nach der individuellen Disposition, dem Alter, der Rasse und der Haltung. Ich verwandte nach seinen Vorschlägen möglichst junge, veredelte und im Schlage gefütterte Tauben, denen ich 0,1 ccm einer 2-tägigen Kultur in

den Brustmuskel injizierte. Zuweilen (bei älteren oder Feldtauben) gab ich auch höhere Dosen bis 0,5 ccm.

Ich schickte die Kulturen hintereinander durch 12 Tauben. Die Tiere zeigten nach 1–2 Tagen Freßunlust, schließlich plötzliche Anfälle von Atemnot und verendeten in kurzer Zeit. Die Sektion ergab hauptsächlich parenchymatöse Degeneration der großen Organe; besonders war die Leber um das Doppelte bis Dreifache vergrößert und wies Rotlaufbacillen in großer Menge auf. Aus dem Herzblute wurde wie bei der Mäusepassage eine Bouillonkultur angelegt und mit dieser nach 2-tägiger Aufbewahrung im Brutschrank die nächste Taube intramuskulär infiziert.

Tabelle IX.
(Taubenpassage.)

Lfd. No.	Datum	Dosis	Resultat	Bemerkung
1	11. Sept. 1908	0,1	† 3	sehr alte Tb. (ca. 8 J.)
2	16. „ „	0,1	lebt	
	22. „ „	1,0	† 2 $\frac{1}{2}$	
2a	22. „ „	0,1	† 2 $\frac{1}{2}$	
3	27. „ „	0,1	† 2 $\frac{1}{2}$	große Tb. Mischrasse bekommt am
4	2. Okt. „	0,1	† 1 $\frac{3}{4}$	
5	6. „ „	0,1	† 2 $\frac{1}{4}$	
6	11. „ „	0,1	† 2 $\frac{1}{4}$	
7	16. „ „	0,1	† 3	
8	2. Nov. „	0,5	† 1 $\frac{3}{4}$	
9	16. „ „	0,2	† 2 $\frac{1}{2}$	
10	23. „ „	0,2	lebt	
	27. „ „	0,5	† 1 $\frac{3}{4}$	
11	1. Dez. „	0,1	† 2 $\frac{1}{2}$	
12	8. „ „	0,1	† 2 $\frac{3}{4}$	

Aus dem Vorstehenden lassen sich manche interessante Einzelheiten entnehmen: Der Infektionsverlauf bei den Tauben 1, 2a, 3 und 4 zeigt eine deutliche und regelmäßige Steigerung der Virulenz für Tauben, deren Ursache ich in dem Umstand vermute, daß alle 4 Tiere demselben Schlage und derselben Zucht entstammten, also von Natur eine ziemlich gleichartige Disposition gegenüber der Erkrankung besaßen. Die Krankheitsdauer bei den übrigen Tieren ist sehr verschieden, doch bleibt bei der Dosis 0,1 ccm der Durchschnitt mit 2 $\frac{1}{2}$ Tagen bis zum Schluß bestehen. Eine Abweichung der Taube 8 von dieser Norm liegt nicht vor, denn gemäß der höheren Dosis ist der Verlauf ein schnellerer. Während ferner bei No. 9 0,2 ccm nicht anders wirken, als sonst 0,1 ccm, tötet diese Dosis bei No. 10 überhaupt nicht, so daß ich zu einer höheren — 0,5 ccm — greifen mußte. Prettners Angaben also, daß Tauben sich dem Rotlaufbacillus gegenüber sehr ungleichmäßig verhalten, und daß die Virulenz für Tauben durch Taubenpassage weder erhöht noch vermindert wird, kann ich bestätigen.

Den aus der Taubenpassage gewonnenen Stamm — ich nenne ihn im folgenden RT — prüfte ich hinsichtlich seiner Virulenz wieder an grauen Mäusen. Eine erste Prüfung nahm ich nach der 8. Passage, eine zweite nach der 12. vor.

Während aus Tabelle X eine Virulenzsteigerung nicht zu folgern ist — die Dosis letalis minima betrug vor der Passage ebenfalls 0,0000001 — ist am Ende derselben noch 0,00000001 ccm imstande, eine Maus zu töten. Demnach wird, wie auch Prettner (l. c.) festgestellt hat, die Virulenz des Rotlaufbacillus durch Taubenpassage für Mäuse erhöht.

Tabelle X.
(Virulenzprüfung von RT während der Passage.)

Datum	Impftiere	Dosis in ccm	Resultat
6. Nov. 1908	2 gr. Mse.	0,0001	a) + $2\frac{1}{2}$, b) + $2\frac{1}{2}$
dgl.	dgl.	0,000001	a) + $3\frac{1}{4}$, b) + $3\frac{1}{2}$
dgl.	dgl.	0,0000001	a) + $4\frac{3}{4}$, b) + $4\frac{3}{4}$
13. Nov. 1908	dgl.	0,00000001	leben

Tabelle XI.
(Virulenzprüfung von RT nach der Passage.)

Datum	Impftiere	Dosis in ccm	Resultat
8. Dez. 1908	2 gr. Mse.	0,000001	+ 4
dgl.	dgl.	0,0000001	} + 5—6
dgl.	dgl.	0,00000001	

III. Untersuchungen über Virulenzveränderungen des Rotlaufbacillus durch Mischinfektion mit *Bacterium coli commune*.

Im Anschluß an die Untersuchungen, die Veränderungen der Virulenz des Rotlaufbacillus durch Passagen betrafen, stellte ich noch solche an, die die Beeinflussung des Rotlaufbacillus durch *Bacterium coli commune* zum Gegenstand hatten.

Dazu wurde ich durch Herrn Direktor Dr. Schreiber veranlaßt, der mich auf die Tatsache aufmerksam machte, daß sich zuweilen aus den Organen von Schweinen, die trotz der Schutzimpfung an Rotlauf eingegangen sind, nach Verimpfung auf graue Mäuse nicht nur Rotlaufbacillen isolieren lassen, sondern auch virulente Coli-Bakterien, die imstande sind, in Reinkultur an Mäuse verimpft, diese in einigen Tagen zu töten, daß also zuweilen Mischinfektionen mit Coli-Bakterien bei Rotlauf eine Rolle zu spielen scheinen. Ich unterzog mich deshalb der Aufgabe, zu prüfen, in welcher Weise sich Rotlaufbacillus und *Bacterium coli commune* des Schweines beeinflussen können. Der Umstand, daß die Rotlaufinfektion vom Darm aus geschieht, läßt die Annahme einer Mischinfektion des nach Olt u. a. (l. c.) im Darm gesunder Schweine fast regelmäßig vorkommenden Rotlaufbacillus mit dem gewöhnlichsten aller Darmbakterien (Heinick, 13) als nicht unwahrscheinlich erscheinen.

Ueber das Verhalten zweier verschiedener Bakterienarten bei Mischinfektion liegen zahlreiche Beobachtungen vor: Nach Friedberger (l. c.) kann die Virulenz gesteigert werden durch gleichzeitige Mitverimpfung anderer, auch unter Umständen gar nicht krankheitsregender Bakterienarten, ja selbst durch gleichzeitige Einverleibung abgetöteter Keime oder steriler Stoffwechselprodukte von Bakterien. Auch Wassermann (14) stellte fest, daß durch Bakterienassoziationen die Virulenz gesteigert werden kann. Monti (15) zeigte, daß die gleichzeitige Einverleibung von sterilen *Proteus*-Kulturen die Virulenz von *Pneumo*-, *Strepto*- und *Staphylokokken* erhöht. Roux und Yersin (16) fanden, daß bei der gleichzeitigen Injektion von *Streptokokken* und einer abgeschwächten für sich allein nicht mehr tödlichen *Diphtheriekultur* die Meerschweinchen rasch an Diphtherie zugrunde gingen, und schlossen daraus, daß die *Streptokokken* einen erhöhenden Einfluß auf die Virulenz des *Diphtheriebacillus* ausüben.

Versuche über Mischinfektionen mit *Bacterium coli commune* liegen vor von Sanarelli (17), Blachstein und Zumft (18), Agrò (19), Levy und Thomas (20); diese ziehen aus ihren Experimenten den Schluß, daß Mischinfektionen mit *Bacterium coli* die Virulenz von Typhus und Cholera steigern. Ueber Assoziationen des *Bacterium coli commune* mit dem Rotlaufbacillus konnte ich in der Literatur keine Angaben finden.

Da ich zu meinen Untersuchungen nicht Schweine benutzen konnte, wählte ich zu Versuchstieren Mäuse und prüfte zunächst, wie diese sich einer Coli-Infektion allein gegenüber verhielten.

Dem Darne eines geschlachteten gesunden Schweines in der Gegend der Ileocökalklappe entnahm ich mit steriler Oese etwas Darmschleim, der in Bouillon durch Umschütteln verteilt wurde. Mit diesem Material wurden Platten gegossen, aus denen sich die Coli-Kolonien leicht isolieren ließen. Die gewonnenen Bakterien zeigten ganz das von Escherich und Pfaundler (21) für das *Bacterium coli commune* des Menschen mitgeteilte Verhalten:

Plumpe, gerade Stäbchen mit abgerundeten Enden, mit Ziehlschem Karbolfuchsin leicht färbbar, nicht nach Gram. Auf Agar wachsen sie üppig als blaßgelbliche, leicht gelappte Kolonien, auf Kartoffel als zuerst gelber, dann „erbsenpüreefarbiger“, später graubraun verfärbter Belag. Sterile Milch wird nach 48-stündiger Aufbewahrung im Brutschrank zur Gerinnung gebracht. In peptonisierter Bouillon entsteht bald eine gleichmäßige, starke Trübung; Bouillon mit Traubenzuckerzusatz läßt Bläschenentwicklung und Gasbildung erkennen. Allmählich nehmen die Kulturen einen eigentümlichen, nicht fauligen Geruch an.

Da als Versuchstiere nur solche in Betracht kamen, die auch für Rotlauf empfänglich sind — das dem *Bacterium coli* gegenüber sehr empfindliche Meerschweinchen mußte ich also ausschließen — prüfte ich die erhaltenen Kulturen zunächst an grauen Mäusen. Die Tiere wurden mit 2-tägigen Bouillonkulturen subkutan infiziert.

Tabelle XII.

Datum	Impftiere	Dosis in ccm	Resultat
7. Nov. 1908 dgl. dgl.	2 gr. Mse. dgl. dgl.	0,01 sk. 0,001 „ 0,0001 „	alle tot nach 2—3 Tagen

Da ich Versuchen mit noch kleineren Dosen wegen der durch die starken Verdünnungen hervorgerufenen unvermeidlichen Fehler aus dem Wege gehen wollte und mit möglichst wenig virulentem Material zu arbeiten gezwungen war, versuchte ich es mit weißen Mäusen. Diese sollen nach Escherich (22) gegen kleinere Dosen unempfindlich sein, was meine Versuche bestätigten. Weiße Mäuse blieben nach subkutaner Einverleibung von 0,01 und selbst 0,1 ccm Coli-Kulturen immer am Leben. Zu meinen Versuchen konnte ich also 0,01 ccm als für sich allein nicht mehr tödliche Dosis verwenden.

Schwieriger lagen die Verhältnisse bei den Rotlaufkulturen. Aus dem oben bei der Prüfung der Coli-Kulturen angeführten Grunde konnte ich die für weiße Mäuse doch so hochgradig pathogenen Rotlaufbacillen nicht ohne weiteres injizieren. Auch eine Abschwächung der Kulturen bis zum Verlust der Virulenz, wie sie Roux und Yersin (l. c.) beim Diphtheriebacillus anwandten, erschien mir wegen der Abweichung von den natürlichen Verhältnissen nicht vorteilhaft.

Deshalb immunisierte ich zunächst weiße Mäuse passiv mit einem vom Pferde gewonnenen Rotlaufschutzserum und injizierte einige Stunden später intraperitoneal 0,01 ccm einer Rotlauf- und sofort danach 0,01 ccm Coli-Kultur subkutan (Tabelle XIV). Um einen genauen Vergleich zu ermöglichen, ließ ich einen Versuch nebenhergehen, der sich von dem beschriebenen nur dadurch unterschied, daß nach der Seruminjektion nur Rotlauf-, keine Coli-Kulturen einverleibt wurden (Tabelle XIII). Aus einer Nebeneinanderstellung der erhaltenen Resultate mußte sich ergeben, ob das Mitverimpfen einer nicht tödlichen Coli-Dosis die Rotlaufimmunität benachteiligt oder nicht.

Tabelle XIII.
(Einfache Rotlaufinfektion.)

Datum	Impftiere	Serumdosis in ccm	Kultur	Resultat
17. Nov. 1908 dgl. dgl.	2 w. Mse. dgl. dgl.	0,0066 sk. 0,01 „ 0,015 „	0,01 Rotlauf- kultur intra- peritoneal	a) + 3 $\frac{1}{2}$, b) + 6 a) + 5, b) + 6 a) + 3 $\frac{1}{2}$, b) + 5
17. Nov. 1908	2 w. Mse.	Kontrollen		a) + 1 $\frac{3}{4}$, b) + 2

Tabelle XIV.
(Rotlauf + Coli.)

Datum	Impftiere	Serumdosis in ccm	Kulturen	Resultat
17. Nov. 1908 dgl. dgl.	2 w. Mse. dgl. dgl.	0,0066 sk. 0,01 „ 0,015 „	0,01 Rotlauf- kultur ip. + 0,01 Coli sk.	a) + 2 $\frac{1}{2}$, b) + 5 $\frac{1}{2}$ a) + 2 $\frac{1}{2}$, b) + 3 $\frac{1}{2}$ a) + 2 $\frac{3}{4}$, b) + 6
17. Nov. 1908	2 w. Mse.	Kontrollen		a) + 1 $\frac{3}{4}$, b) + 1 $\frac{3}{4}$

Zunächst fällt auf, daß die Wahl des benutzten Rotlaufstammes insofern eine unglückliche war, als das Serum auch gegen ihn allein in den angeführten Dosen in keinem Falle schützte, obwohl es gegen den zu seiner Herstellung verwandten Stamm ausreichenden Schutz bot, wie ich den Institutsprotokollen entnehmen konnte. Als Analogon verweise ich auf die Tabellen II und III.

Dennoch zeigt ein Vergleich beider Tabellen, daß die mit Rotlauf und Coli geimpften Mäuse durchschnittlich früher starben als die nur mit Rotlauf infizierten: Während von jenen 3 in 2—3, 1 in 3—4 Tagen und 2 noch später starben, verendeten von diesen nur 2 in 3—4, 4 erst in 4—6 Tagen. Die Reihen weisen ferner eine große Unregelmäßigkeit auf, die ich zunächst einer zu großen Virulenz des Rotlaufstammes zuschiebe (die Kontrollen in Tabelle XIII starben in 1 $\frac{3}{4}$ bzw. 2 Tagen!). Ferner glaube ich, daß das injizierte Serum auf die ebenfalls subkutan verabreichten Coli-Kulturen durch seinen Gehalt an Karbolglyzerin entwicklungshemmend gewirkt hat, eine Annahme, die dadurch unterstützt wurde, daß sich in den Organen der eingegangenen Mäuse nur Rotlaufbacillen, nie Coli-Bakterien fanden.

Ich wiederholte daher den Versuch mit der Maßgabe, daß ich diesmal einen weniger virulenten Rotlaufstamm verwandte, etwas höhere Serumdosen gab und die Coli-Kulturen intraperitoneal wie die Rotlaufkulturen einverleibte. Vorher prüfte ich die Pathogenität des *Bacterium coli commune* für weiße Mäuse bei intraperitonealer Appli-

kation und fand, daß 0,1 zuweilen, 0,01 ccm nie imstande war, eine weiße Maus zu töten.

Tabelle XV.
(Einfache Rotlaufinfektion.)

Datum	Impftiere	Serumdosis in ccm	Kultur	Resultat
1. Dez. 1908 dgl. dgl.	2 w. Mse. dgl. dgl.	0,01 sk. 0,015 „ 0,02 „	0,01 Rotlauf- kultur ip.	leben sämtlich + 2¼
1. Dez. 1908	1 w. Ms.	Kontrolle		

Tabelle XVI.
(Rotlauf + Coli.)

Datum	Impftiere	Serumdosis in ccm	Kulturen	Resultat
1. Dez. 1908 dgl. dgl.	2 w. Mse. dgl. dgl.	0,01 sk. 0,015 „ 0,02 „	0,01 Rotlauf- kultur ip. + 0,01 Coli ip.	a) + 4, b) + 7 a) + 2¼, b) + 4 leben
1. Dez. 1908	1 w. Ms.	Kontrolle		+ 1¼
1. Dez. 1908	1 w. Ms.	Kontrolle	nur 0,01 Coli ip.	lebt

Vergleicht man beide Tabellen, so fällt auf, daß in Tabelle XV die Kontrolle in 2¼, in Tabelle XVI schon in 1¼ Tagen starb, ferner, daß das Serum vollen Schutz gewährte gegen die Alleininfektion mit Rotlauf, gegen die Mischinfektion aber nur in der größten Dosis (0,02).

Es ergibt sich also, daß gegen Rotlauf passiv immunisierte weiße Mäuse einer einfachen Rotlaufinfektion leichter widerstehen als einer Mischinfektion von Rotlauf- und Coli-Bakterien, mit anderen Worten: Durch eine Mischinfektion wird die Rotlaufimmunität nachteilig beeinflusst, derart, daß eine geringgradige Immunität (hervorgerufen durch die kleinen Serumdosen) bei einer gleichzeitigen Infektion mit *Bacterium coli commune* nicht vorhält, sondern nur eine hochgradige (der größeren Serumdosis entsprechend).

Die Frage, ob diese Verhältnisse nicht nur für die Infektion weißer Mäuse, sondern auch für die von Schweinen Geltung haben, wäre nur durch umfangreiche Versuche an Schweinen zu beantworten. Es würde sich dabei erweisen, ob die Coli-Infektion ein Moment ist, das die Virulenz des saprophytisch im Darne lebenden Rotlaufbacillus zu erhöhen bzw. eine bestehende Rotlaufimmunität abzuschwächen imstande ist.

B. Stammverschiedenheiten.

Die folgenden Versuche stellte ich an, um zu prüfen, ob sich die im ersten Teil der Arbeit beschriebenen, durch verschiedene Passagen — Nährböden, Mäuse und Tauben — erhaltenen und in ihrer Virulenz sehr ungleichen Rotlaufstämme nur eben durch ihre Virulenz oder auch noch durch ein anderes biologisches Verhalten unterscheiden, mit anderen Worten, ob sie gegeneinander Stammesverschiedenheiten aufweisen. Stammverschieden nenne ich zwei Stämme, wenn ein durch Immunisierung mit dem ersten hergestelltes Serum gegen den zweiten nicht schützt, und umgekehrt.

Am bekanntesten sind die Stammverschiedenheiten des *Bacterium coli commune* des Menschen, das nach Pfaundler (23) sogar für identisch mit dem *Bacterium typhi* gehalten wurde, weil Typhuserum gegen eine etwas höhere Dosis Coli-Kulturen schütze, und vice versa. Ferner ist es die natürliche Verschiedenheit der Stämme, die beim *Bacillus suisepcticus* die Herstellung eines immer wirk-samen Serums so schwierig macht.

Was die Stammverschiedenheiten betrifft, die der Rotlaufbacillus durch Anpassung an bestimmte biologische Verhältnisse, z. B. an die Lebensbedingungen einer bestimmten Tierart, annimmt, so ist zunächst auf den sogenannten *Bacillus murisepticus* hinzuweisen. Wie Kitt (24) mitteilt, sind zwar zwischen Rotlauf- und Mäusesep-tikämiebacillus geringe morphologische und kulturelle Unterschiede festgestellt worden, jedoch spreche die von Lorenz ermittelte Tatsache, daß rotlauf-immune Kaninchen auch gegen Mäusesep-tikämie Immunität gewinnen, und umgekehrt Kaninchen, die Mäusesep-tikämie überstanden, immun gegen Rotlauf waren, für die Identität oder wenigstens Rasseverwandtschaft beider Bakterien. Neuerdings hat Schipp (25) gefunden, daß zwei morphologisch, tinktoriell und kulturell dem Schweinerotlaufbacillus vollkommen gleichende Bakterien, α und β , der eine beim Rinde eine seuchenhafte Erkrankung, der andere bei Hühnern ein Massensterben hervorrufe. Biologisch soll der *Bacillus* α dem Schweinerotlauf sehr fernstehen, vom *Bacillus* β ist noch nicht entschieden, ob er mit dem *Bacillus erysipelatis* identisch, oder ob er nur eine Stammes- oder Virulenzvarietät ist.

Daß der von mir behandelte Rotlaufstamm durch die Nährböden-, Mäuse- und Taubenpassage eine Veränderung erfahren hatte, zeigten mir nicht nur die Virulenzprüfungen für die erhaltenen Stämme (RN, RMs und RT), sondern auch das Verhalten derselben in Gelatine-stichen. Es ergab sich nämlich, daß alle 3 Stämme auf dem genannten Nährboden ein anderes Aussehen hatten. RN und RT zeigten zwar beide das typische Gläserbürstenwachstum, doch während RT scharf abgesetzte, vom Stichkanal nach allen Seiten kurz ausstrahlende Kolo-nieen bildete, verschwammen bei RN die etwas längeren Strahlen bald ineinander, so daß die Kolonien das Bild einer den Stichkanal umgebenden wolkigen Trübung aufwiesen. RMs dagegen zeigte das Gläserbürstenwachstum überhaupt nicht, sondern bildete mehrere kugelige, in der Stichrichtung etwas plattgedrückt erscheinende Kolonien, aus denen nach 6 Tagen zum Teil feine, zarte, verzweigte Fäden, wie Würzelchen, nach der Peripherie zu wuchsen. Auf Agar-Agar wie auf Bouillon zeigten alle 3 Stämme das gleiche Aussehen. Auch morphologisch und tinktoriell ließen sie sich nicht voneinander unterscheiden.

Das eigentümliche verschiedene kulturelle Verhalten der Passagen-stämme auf Gelatine schien mir eine nähere Untersuchung darüber, ob sie untereinander derartig stammverschieden sind, daß ihre Sera gegen sie wechselseitig verschieden schützen, noch mehr zu rechtfertigen.

Der Plan, den ich den folgenden Untersuchungen zugrunde legte, war der, daß ich mit den 3 Stämmen Kaninchen immunisierte und die von ihnen gewonnenen Sera einzeln gegen die verschiedenen Stämme ausspielte. Zum Vergleich bediente ich mich noch eines vierten Rotlauf-stammes — nach den Institutsprotokollen nenne ich ihn R36 — der aus der Milz eines an perakutem Rotlauf gefallenem Schweines isoliert war und noch keine Passagebehandlung durchgemacht hatte. Eine mit ihm

vorgenommene Virulenzprüfung an grauen Mäusen ergab als kleinste sicher tödliche Dosis 0,000001 ccm einer 48-stündigen Kultur.

Tabelle XVII.
(Virulenzprüfung R 36.)

Datum	Impftiere	Dosis in ccm	Resultat
1. Dez. 1908	2 gr. Mse.	0,00001 sk.	} † 3 ¹ / ₄ —4 ¹ / ₂ a) † 7, b) lebt leben
dgl.	dgl.	0,000001 „	
25. Nov. 1908	dgl.	0,0000001 „	
dgl.	dgl.	0,00000001 „	

Mit den 4 Stämmen immunisierte ich Kaninchen in steigenden Dosen (Tabelle XVIII—XXI).

Das beim Entbluten in sterilen Reagensgläsern gewonnene Blut ließ ich absetzen und pipettierte das Serum ab. Um Volumveränderungen des Serums zu vermeiden, wandte ich als Konservierungsmittel statt

Tabelle XVIII.
R 36—Kn I und Ia.

Abzeichen: Beide Ohren rot.
Gewicht: 1925 g.

No.	Datum	Kulturdosis	Art der Impfung	Bemerkungen
I	1. Nov. 1908	0,01	subkut.	† nach 5 Tagen. Bakt. u. Sektionsbefund: Rotlauf
Ia	7. Nov. 1908 Gew. 2000 g	0,001	subkut.	Erkrankt nach 7 Tagen unter Darm- und Lähmungserscheinungen. Erholt sich wieder
Ia	21. Nov. 1908	0,1	intraper.	
Ia	27. „ 1908	0,1		
Ia	3. Dez. 1908	0,5		

Kn Ia entblutet am 11. Dez. 1908.
Gewicht: 1950 g.

Tabelle XIX.
RN—Kn II.

Abzeichen: Linkes Ohr rot.
Gewicht: 1950 g.

Datum	Dosis in ccm	Art der Impfung
1. Nov. 1908	0,01	subkutan
8. „ „	0,1	„
16. „ „	0,1	intraperitoneal
25. „ „	0,5	„

Entblutet am 3. Dez. 1908. Gewicht: 2450 g.

Tabelle XX.
RMs—Kn III.

Abzeichen: Rechtes Ohr rot.
Gewicht: 1950 g.

Datum	Dosis	Art der Impfung
1. Nov. 1908	0,01	subkutan
8. „ „	0,1	„
15. „ „	0,1	intraperitoneal
22. „ „	0,5	„

Entblutet am 30. Nov. 1908. Gewicht: 2250 g.

Tabelle XXI.

RT—Kn IV.

Ohne Abzeichen. Gewicht: 2000 g.

Datum	Kulturdosis	Art der Impfung
6. Nov. 1908	0,01	subkutan
13. „ „	0,1	„
21. „ „	0,1	intraperitoneal
1. Dez. „	0,5	„

Entblutet am 9. Dez. 1908. Gewicht: 2520 g.

des gebräuchlichen Karbolglyzerins das von Emmerich (26) und Kronacher (27) untersuchte und empfohlene Diaphtherin oder Oxychinaseptol an (0,1 g auf 100 g Serum).

Die vier erhaltenen Sera, die ich nach ihren Stämmen SR 36, SRN, SRMs und SRT nennen will, prüfte ich nunmehr an grauen Mäusen gegen die zu ihrer Herstellung verwandten Rotlaufstämme. Nach Marx' (28) Methode gab ich den grauen Mäusen erst das Serum subkutan, dann nach 24 Stunden, um dem Immunkörper des Serums genügend Zeit zur Aktivierung zu lassen, 2-tägige Kulturen, jedoch nicht intraperitoneal, sondern analog den vorhergegangenen Virulenzprüfungen subkutan. Ich injizierte von jedem Stamme zunächst die ungefähr der 1000-fachen Dosis letalis minima entsprechende Kulturmenge, d. h. von RMs 0,001, von RN 0,1, von RT 0,001, von R 36 0,001 ccm. Als sich während der ersten Versuche herausstellte, daß einerseits die gewonnenen Sera ziemlich wirksam waren, andererseits aber die Virulenz der Kulturen sich verminderte, steigerte ich die Kulturdosen noch um das 10-fache, d. h. 0,01 ccm bei RMs, RT und R 36. Wie schon oben erwähnt (cf. Tabelle V usw.), sank die Virulenz von RN trotz 1- bis 2-tägigen Umstechens von Bouillon auf Bouillon und trotz des üppigsten Wachstums auf diesem Substrat so schnell, daß bald 0,5 ccm nicht mehr in stande waren, die Kontrollen zu töten, ich also gezwungen war, von Serumprüfungen gegen diesen Stamm ganz abzusehen.

Aus den Tabellen XXII—XXV ergibt sich, daß die Passagenstämme irgendwelche Stammesverschiedenheiten untereinander nicht aufweisen: Ein mit dem einen hergestelltes Serum schützt immer gegen den anderen. Auch das durch Immunisierung mit dem Vergleichsstamm R 36 gewonnene Serum schützte immer gegen die übrigen Stämme. Die Sera der Passagenstämme dagegen gewährten in einem Falle keinen vollkommenen Schutz gegen R 36, wie aus Tabelle XXIV ersichtlich ist, indem SRT nur den Verlauf der Infektion mit R 36 auf 6—7 Tage verlängerte. Da dies immerhin eine Beeinflussung von R 36 durch SRT bedeutet und ja auch nicht alle Tiere der Infektion erlagen, läßt sich nach den Tab. XXII—XXV das Vorhandensein besonderer Stammeseigentümlichkeiten für die 4 Versuchsstämme verneinen.

Da während der Zeit von der ersten Immunisierung der Kaninchen ab bis zu den letzten Prüfungen über 2 Monate verstrichen waren und R 36 während dieser Zeit ebenfalls 1—2 Tage nach Bedarf auf Bouillon neu umgestochen wurde, lag die Vermutung nahe, daß auch dieser Stamm bei den letzten Prüfungen nicht mehr original war, sondern sich ähnlich wie RN, nur nicht in demselben Grade, zu einem „Nährbodenpassagenstamm“ umgewandelt habe. Deshalb hielt ich es für vorteilhaft, die 4 Sera nochmals zu prüfen, und zwar an einer möglichst originalen Rotlaufkultur. Als solche stand mir wiederum R 36 zur Verfügung, mit der

Maßgabe, daß dieser Stamm durch die im Institut zur gleichmäßigen Beibehaltung der Virulenz angewandte Aufbewahrungsmethode sich ziemlich gleich geblieben war, wie einige orientierende Vorversuche ergaben. Zur Kontrolle ließ ich eine Virulenzprüfung nebenhergehen.

Die Dosis letalis minima ist sich also ziemlich gleich geblieben (cf. Tabelle XVII) und beträgt wie früher 0,000001 ccm. Ich prüfte nunmehr die 4 Sera SR36, SRN, SRMs, SRT gegen den beschriebenen Stamm R 36.

Tabelle XXII.

(Prüfung von mit SRMs immunisierten Mäusen gegen RMs, RN, RT und R 36.)

Datum	Impftiere	Serumdosis	Stamm und Kulturdosis	Resultat
12. Dez. 1908 dgl.	2 gr. Mse. dgl.	SRMs 0,1 " 0,05	RMs 0,001 dgl.	} leben † 3
29. Dez. 1908 dgl. dgl.	dgl. dgl. 1 gr. Ms.	" 0,025 " 0,01 —	RMs 0,01 dgl. dgl.	
12. Dez. 1908 dgl.	2 gr. Mse. dgl.	SRMs 0,1 " 0,05	RN 0,1 dgl.	
29. Dez. 1908 dgl. dgl.	dgl. dgl. 1 gr. Ms.	" 0,025 " 0,01 —	RN 0,5 dgl. dgl.	
12. Dez. 1908 dgl.	2 gr. Mse. dgl.	SRMs 0,1 " 0,05	RT 0,001 dgl.	} leben † 2 ³ / ₄
29. Dez. 1908 dgl. dgl.	dgl. dgl. 1 gr. Ms.	" 0,025 " 0,01 —	RT 0,01 dgl. dgl.	
12. Dez. 1908 dgl.	2 gr. Mse. dgl.	SRMs 0,1 " 0,05	R 36 0,001 dgl.	
29. Dez. 1908 dgl. dgl.	dgl. dgl. 1 gr. Ms.	" 0,025 " 0,01 —	R 36 0,01 dgl. dgl.	

Tabelle XXIII.

(Prüfung von mit SRN immunisierten Mäusen gegen RT, R 36, RMs.)

Datum	Impftiere	Serumdosis	Stamm und Kulturdosis	Resultat
14. Dez. 1908 dgl.	2 gr. Mse. dgl.	SRN 0,1 " 0,05	RT 0,001 dgl.	} leben † 3
4. Jan. 1909 dgl. dgl.	dgl. dgl. 1 gr. Ms.	" 0,025 " 0,01 —	RT 0,01 dgl. dgl.	
14. Dez. 1908 dgl.	2 gr. Mse. dgl.	SRN 0,1 " 0,05	R 36 0,001 dgl.	
4. Jan. 1909 dgl. dgl.	dgl. dgl. 1 gr. Ms.	" 0,025 " 0,01 —	R 36 0,01 dgl. dgl.	
14. Dez. 1908 dgl.	2 gr. Mse. dgl.	SRN 0,1 " 0,05	RMs 0,001 dgl.	} leben † 3
4. Jan. 1909 dgl. dgl.	dgl. dgl. 1 gr. Ms.	" 0,025 " 0,01 —	RMs 0,01 dgl. dgl.	

2*

Tabelle XXIV.
(Prüfung von mit SRT immunisierten Mäusen gegen RT, R 36, RMs. und RN.)

Datum	Impftiere	Serumdosis	Stamm und Kulturdosis	Resultat
18. Dez. 1908 dgl. dgl.	2 gr. Mse. dgl. 1 gr. Ms.	SRT 0,025 " 0,01 —	RT 0,001 dgl. dgl.	} leben + 2 ³ / ₄
4. Jan. 1909 dgl. dgl.	2 gr. Mse. dgl. 1 gr. Ms.	" 0,025 " 0,01 —	RT 0,01 dgl. dgl.	} leben + 3
18. Dez. 1908 dgl. dgl.	2 gr. Mse. dgl. 1 gr. Ms.	SRT 0,025 " 0,01 —	R36 0,001 dgl. dgl.	a) + 6, b) + 7 a) + 7, b) lebt + 1 ³ / ₄
4. Jan. 1909 dgl. dgl.	2 gr. Mse. dgl. 1 gr. Ms.	" 0,025 " 0,01 —	R36 0,01 dgl. dgl.	} leben + 2
18. Dez. 1908 dgl. dgl.	2 gr. Mse. dgl. 1 gr. Ms.	SRT 0,025 " 0,01 —	RMs. 0,001 dgl. dgl.	} leben + 3 ¹ / ₂
4. Jan. 1909 dgl. dgl.	2 gr. Mse. dgl. 1 gr. Ms.	" 0,025 " 0,01 —	RMs. 0,01 dgl. dgl.	} leben + 4
18. Dez. 1908 dgl. dgl.	2 gr. Mse. dgl. 1 gr. Ms.	SRT 0,025 " 0,01 —	RN 0,1 dgl. dgl.	} leben

Tabelle XXV.
(Prüfung von mit SR 36 immunisierten Mäusen gegen R 36, RMs., RN, und RT.)

Datum	Impftiere	Serumdosis	Stamm und Kulturmenge	Resultate
22. Dez. 1908 dgl. dgl.	2 gr. Mse. dgl. 1 gr. Ms.	SR 36 0,025 " 0,01 —	R 36 0,001 dgl. dgl.	} leben + 2 ¹ / ₂
9. Jan. 1909 dgl. dgl.	2 gr. Mse. dgl. 1 gr. Ms.	" 0,025 " 0,01 —	R 36 0,01 dgl. dgl.	} leben + 2 ³ / ₄
22. Dez. 1908 dgl. dgl.	2 gr. Mse. dgl. 1 gr. Ms.	SR 36 0,025 " 0,01 —	RMs 0,001 dgl. dgl.	} leben + 3 ¹ / ₂
9. Jan. 1909 dgl. dgl.	2 gr. Mse. dgl. 1 gr. Ms.	" 0,025 " 0,01 —	RMs 0,01 dgl. dgl.	} leben + 3 ¹ / ₂
22. Dez. 1908 dgl. dgl.	2 gr. Mse. dgl. 1 gr. Ms.	SR 36 0,025 " 0,01 —	RN 0,1 dgl. dgl.	} leben
22. Dez. 1908 dgl. dgl.	2 gr. Mse. dgl. 1 gr. Ms.	SR 36 0,025 " 0,01 —	RT 0,001 dgl. dgl.	} leben + 2 ¹ / ₂
9. Jan. 1909 dgl. dgl.	2 gr. Mse. dgl. 1 gr. Ms.	" 0,025 " 0,01 —	RT 0,01 dgl. dgl.	} leben + 2 ¹ / ₄

Tabelle XXVI.
(Virulenzprüfung von R 36.)

Datum	Impftiere	Dosis R 36	Resultat
16. Jan. 1909 dgl. dgl. dgl.	2 gr. Mse. dgl. dgl. dgl.	0,01 sk. 0,00001 " 0,000001 " 0,0000001 "	a) + 2, b) + 2 ¹ / ₂ a) + 3, b) + 3 ¹ / ₄ a) + 3 ¹ / ₄ , b) lebt leben

Tabelle XXVII.

(Prüfung von mit SR36, SRN, SRMs und SRT immunisierten Mäusen gegen den originalen Stamm R 36.)

Datum	Impftiere	Serum und Dosis	Kultur	Resultat
16. Jan. 1909 dgl. dgl.	2 gr. Mse. dgl. dgl.	SR 36—0,0066 „ —0,01 „ —0,015	R 36 0,01 dgl. dgl.	} leben a) lebt, b) fällt aus
16. Jan. 1909 dgl. dgl.	2 gr. Mse. dgl. dgl.	SRN—0,0066 „ —0,01 „ —0,015	R 36 0,01 dgl. dgl.	a) † 6, b) lebt } leben
16. Jan. 1909 dgl. dgl.	2 gr. Mse. dgl. dgl.	SRMs—0,0066 „ —0,01 „ —0,015	R 36 0,01 dgl. dgl.	a) † 5, b) † 7 a) † 6, b) † 6 leben
16. Jan. 1909 dgl. dgl.	2 gr. Mse. dgl. dgl.	SRT—0,0066 „ —0,01 „ —0,015	R 36 0,01 dgl. dgl.	a) † 4, b) † 6 a) † 4, b) † 7½ leben
16. Jan. 1909	2 gr. Mse.	—	R 36 0,01	a) † 2, b) † 2¼

Wie die Tabelle wiederum zeigt, besitzen die 4 Kaninchensera eine hervorragende Schutzkraft, die der eines Pferdeserums nicht nachsteht, sondern sie eher noch übertrifft. Ich erkläre mir dies nach der Ehrlich'schen Theorie damit, daß das Serum vom Kaninchen als das eines für den Rotlauf empfänglichen Tieres besonders geeignete Komplemente in größerer Menge im Mäusekörper vorfindet, als das des von Natur rotlauf-immunen Pferdes.

Der Schutz, den die 4 Sera bewirken, ist jedoch nicht gleich stark. Es zeigt sich, daß SR 36 am besten gegen den eigenen Stamm schützt, da alle Mäuse am Leben bleiben (mit einem Ausfall, dessen Ursache in einer interkurrierenden Krankheit zu suchen war); fast ebenso wirksam ist SRN, das nur in einem Falle in der kleinsten Dosis nicht schützt. Dann folgen SRMs und SRT, die nur in der größten Dosis — 0,015 ccm — die Impftiere am Leben erhalten. Dies ist um so eigentümlicher, als die Stämme RM und RT doch an Virulenz RN bedeutend übertrafen. Ueber die Frage, ob dieser seltsame Umstand in einem besonderen individuellen Verhalten des betreffenden Serumtieres seinen Grund hat oder in anderen Ursachen, lassen die Versuche keinen Schluß zu.

Jedenfalls kann auf Grund von Tabelle XXVII das Bestehen von Stammesunterschieden bei den benutzten Stämmen nicht behauptet werden, da in der Dosis 0,015 ccm alle Sera gegen R 36 Schutz gewährten.

Es ist somit aus der vorliegenden Arbeit der Schluß zu ziehen, daß längere Laboratoriumsbehandlung auf die Rotlaufkulturen von großem Einfluß ist, so daß es sich für die Immunisierungstechnik bei Rotlauf empfehlen würde, nur möglichst originale, nicht veränderte Kulturen und nur mit solchen hergestellte Sera zu verwenden.

Ergebnisse.

1) Die Virulenz des Rotlaufbacillus wird durch lange Nährbödenpassage (Bouillon und Agar) allmählich herabgesetzt. Die Virulenzabnahme erfolgt nicht gleichmäßig: Sie nimmt mit der Züchtungsdauer zu und kann schließlich zum vollständigen Verlust der Virulenz für Mäuse führen.

2) Nach Passage durch weiße Mäuse bleibt die Virulenz für weiße Mäuse erhalten, für graue wird sie um ein geringes herabgesetzt.

3) Durch Taubenpassage wird die Virulenz des Rotlaufbacillus für diese Tierart beibehalten, für graue Mäuse aber erhöht.

4) Gegen Rotlauf passiv immunisierte weiße Mäuse, die einer einfachen

Rotlaufinfektion widerstehen, sterben bei gleichzeitiger Injektion einer für sich allein nicht tödlichen Dosis von Kulturen des *Bacterium coli commune* des Schweines.

5) Die durch längere Nährböden-, Mäuse- und Taubenpassagen erhaltenen Rotlaufstämme unterscheiden sich auffallend durch ihr Wachstum in Gelatinestichen.

6) Stammesunterschiede des Rotlaufbacillus lassen sich durch künstliche Passagebehandlung nicht erzeugen. Die mit den Passagestämmen hergestellten Sera schützen gegen ihre Kulturen wechselseitig.

Zum Schluß spreche ich Herrn Dr. Schreiber für die freundliche Ueberlassung des Materials und die bereitwillige Unterstützung meinen aufrichtigsten Dank aus.

Literatur.

- 1) Schreiber, Vortrag gehalten auf der 79. Versammlung deutscher Naturforscher und Aerzte in Dresden. (Dtsche tierärztl. Wochenschr. Jahrg. XV. No. 49.)
- 2) Olt, Dtsche tierärztl. Wochenschr. 1901. p. 41.
- 3) Bauermeister, Arch. f. wissenschaftl. Tierheilk. Bd. XXVIII. p. 66.
- 4) Jensen, Maanedsskrift for Dyrlaeger, Ref. in d. Berl. tierärztl. Wochenschr. 1902. No. 1.
- 5) Pitt, Inaug.-Diss. Gießen 1907.
- 6) van Velzen, Inaug.-Diss. Bern 1908.
- 7) Preisz, Immunität beim Rotlauf der Schweine. (Handb. d. path. Mikroorg. von Kolle-Wassermann. Bd. IV. 1903. p. 1242.)
- 8) Prettner, Der derzeitige Stand der tierärztlichen Schutzimpfungen usw. (Tierärztl. Centralbl. 1906. No. 17—19.)
- 9) Friedberger, Die allgemeinen Methoden der Bakteriologie. (Handb. d. path. Mikroorg. Bd. I. p. 516.)
- 10) Lorenz, Bericht auf dem internationalen tierärztl. Kongreß Baden-Baden. 1899.
- 11) Pasteur et Thuillier, Compt. rend. de l'Acad. de sc. T. XCVII.
- 12) Prettner, Das Rotlaufschutz- und Heilserum. (Tierärztl. Centralbl. 1906. No. 21—23.)
- 13) Heinick, Arch. f. wissenschaftl. u. prakt. Tierheilk. 1903. p. 489.
- 14) Wassermann, Misch- und Sekundärinfektion. (Handb. d. path. Mikroorg. von Kolle-Wassermann. Bd. I. 1903. p. 321.)
- 15) Monti, Atti d. R. Accad. dei Lincei. 1889.
- 16) Roux et Yersin, Ann. Pasteur. 1891.
- 17) Sanarelli, zitiert nach Kolle-Wassermann, Handb. f. path. Mikroorg. Bd. I. p. 321.
- 18) Blachstein u. Zumft, zitiert nach Kolle-Wassermann, Handb. f. path. Mikroorg. Bd. I. p. 321.
- 19) Agrò, zitiert nach Kolle-Wassermann, Handb. d. path. Mikroorg. Bd. I. p. 321.
- 20) Levy u. Thomas, zitiert nach Kolle-Wassermann, Handb. d. path. Mikroorg. Bd. I. p. 321.
- 21) Escherich u. Pfaundler, *Bacterium coli commune*. (Handb. d. path. Mikroorg. von Kolle-Wassermann. Bd. II. p. 334.)
- 22) Escherich, zitiert in Kolle-Wassermann, Handb. d. path. Mikroorg. Bd. II. p. 382.
- 23) Pfaundler, Spezielle Immunitätslehre betr. *Bacterium coli commune*. (Handb. d. path. Mikr. Bd. IV. p. 907.)
- 24) Kitt, Bakterienkunde und pathologische Mikroskopie. 1892. p. 289.
- 25) Schipp, Ref. in d. Berl. tierärztl. Wochenschr. 1908. No. 44.
- 26) Emmerich, L'oxyquinaseptol ou diaphthérine, antiseptique nouveau.
- 27) Kronacher, De l'emploi d'oxychinaseptol (diaphthérine).
- 28) Marx, Die Wertbestimmung des Schweinerotlaufserums. (Dtsche tierärztl. Wochenschrift. 1901. No. 6.)

Nachdruck verboten.

Contribution à l'étude de la variole et du vaccin et des autres maladies similaires.

Par le Prof. Dr. Camillo Terni, Milano, Italie.

Avec 3 tableaux.

Introduction.

Les observations les plus récentes sur l'étiologie et pathogénie de la variole et du vaccin ont établi une affinité toujours plus intime entre l'une et l'autre maladie; et en tant qu'on peut conclure des expériences, il reste affirmé que si même il s'agit de virus de différentes espèces, ils donnent lieu à des lésions identiques du point de vue clinique et anatomo-pathologique. Pour cela, vu la difficulté d'entreprendre des expériences continues avec le virus de la variole, nous pouvons suivre avec autant de sûreté les recherches avec le virus du vaccin (cow-pox, horse-pox), et nous rapporter quant aux résultats aussi à la variole humaine.

Jusqu'à maintenant les recherches sur la nature de ces virus ont conduit à deux séries d'observations en parfaite antithèse.

Hallier et Golgi d'abord, et en suite L. Pfeiffer et M. Funk avaient signalé dans les produits et tissus des pustules varioleuses et vaccinales des éléments cellulaires spéciaux, caractérisés par des granules très brillants, réunis en groupes dans le corps de la cellule, ou disséminés dans la lymphe dans un phase avancée de l'infection. Pfeiffer défini la nature de ces éléments observés dans les sections de pustules varioleuses pour de vrais et propres formes d'un parasite sporozoaire; et Funk a considéré ces mêmes formes comme appartenantes à un sporozoaire cystique (*Sporidium vaccinale*) dans la phase de sporoblaste. Hallier, à son temps, avait définie les mêmes formations rondes comme des microcoques dérivants d'une moisissure à schizo-sporange, le *Stemphylium septosporium*.

Ces observations furent confirmées et complétées par celles de Guarnieri sur le vaccin et la variole, et par les études successives de Monti, Piana et Galli-Valerio, Wasielewski, Hückel, Ishigami et d'autres, jusqu'aux travaux plus récentes de Councilman, Magarh, Brinkerhoff, Tyzzer, Bancroft et Calkins.

Guarnieri démontra que l'inoculation du vaccin dans la cornée du lapin détermine des lésions spécifiques, caractérisés par la présence dans les cellules de l'épithèle cornéale de corps ronds, fortement brillants, délimités par un contour et avec une grande affinité quant aux couleurs nucléaires. Pour le développement de ces corpuscules dans la cellule a lieu le déplacement du nucléus et une érosion du protoplasme cellulaire jusqu'à la mort de la cellule épithéliale. Ainsi fut éclairci le procès pathogène qui se passe dans la pustule varioleuse et vaccinique avec la destruction des cellules formatives du corps muqueux dans l'espace correspondant à la même. Ces formations endocellulaires furent considérées par Guarnieri pour de vrais parasites du vaccin, et de la manière comme leur action destructive avient dans la cellule, il les a dénommées *Cytoryctes vaccinae* et *variolae*.

Monti observa des formes semblables dans les pustules varioleuses et les reproduisit moyennant l'inoculation cornéale dans le lapin; c'est

pourquoi il se croyait autorisé à les définir pour des *Cytoryctes variolae*, en confirmant complètement l'interprétation de Guarnieri quant à la nature parasitaire de ces corps et à leur action pathogène. Les autres observateurs, et surtout Hückel, Wasielewski et Ishigami, apportèrent en suite de nouvelles et plus importantes contributions à la théorie parasitaire des corps de Guarnieri en cherchant de coordonner les différentes formes visibles dans l'épithèle cornéal et dans la lymphe et les tissus de la pustule vaccinique, pour démontrer le cycle évolutif du parasite. Dans la même direction se développèrent les recherches plus récentes des observateurs américains, et Calkins, avec les formes visibles dans les pustules varioleuses et vacciniques, établit — par analogie avec d'autres formes parasitaires semblables, trouvées précédemment par lui dans le *Paramaecium caudatum* (*Cytoryctes cytoryctoides* nov. gen. et spec. Calk.) — un cycle évolutif du *Cytoryctes variolae* et *Cytoryctes vaccinae*, en classifiant ces parasites dans les Sporozoaires, ordre de Microsporidia, famille de Cytoryctidae.

Les Cytoryctides, selon Thélohan, Doflein, Minchin et Calkins, se différencient des autres Sporozoaires, et surtout des Haemosporides parce qu'il présentent un pansporoblaste sans membrane et nucléus.

Pour mieux définir le cycle évolutif des Cytoryctes, Calkins se rapporte à des espèces analogues comme les Nosemides (ou Glugéides de Thélohan), le type du genre est représenté du *Nosema* ou *Glugea bombycis* (Nägeli) dans lesquelles le zygote (ou forme améboïde primitive), délivré de la capsule, pénètre dans la cellule de l'épithèle intestinal, devient polynucléé par des mitoses successives du nucléus, et les formes dérivées enfin se transforment chacune en pansporoblaste qui à son tour origine des spores. Mais selon Calkins le cycle évolutif des Cytoryctes de la variole et du vaccin serait beaucoup plus compliqué. Le premier développement du germe dans l'hôte est inconnu, et probablement se passe dans le lieu primaire de l'infection en formant un organisme qui se reproduit par des germes probablement semblables à ceux que Calkins appelle gemmules, comme il avient dans le procès connu, appelé par Doflein reproduction multiplicative. Les gemmules sont probablement transportées avec le sang à la peau où a lieu l'ultérieur développement. Cette première phase du développement est purement conjecturale, mais de ce point, selon Calkins, les observations seraient parfaitement complètes. Les gemmules deviennent des organismes intracellulaires (cytoplasmiques) améboïdes qui engendrent des gemmules semblables. Ce procès de reproduction que Councilman a désigné avec le terme de cycle vaccinique, continu pour un certain temps, parce que dans la variole p. ex. les gemmules sont distribuées sur toutes les régions de la peau. Enfin les germes engendrés de cette manière donnent lieu à des formes qui pénètrent dans la membrane nucléaire et se transforment en gamétocytes (?) de deux types: les uns supposés des gamètes masculins, et les autres féminins. Les gamètes s'accouplent et le zygote ainsi formé se transforme dans un organisme améboïde relativement grand duquel ont origine les pansporoblastes. Ceux-ci donnent lieu en suite aux sporoblastes primaires qui engendrent de nombreuses spores. Le procès entier se passe dans le nucléus et correspond à la phase nommée reproduction propagative des autres sporozoaires. Les spores ainsi formées peuvent infecter de nouveaux nucléi et se développer en de

nouveaux sporoblastes secondaires, qui engendrent à leur tour de nouvelles spores semblables, une vraie schizogonie, et une seconde manière d'auto-infection, par laquelle le parasite se répand à travers les nucléi et les cellules de la peau dans beaucoup d'autres organes du corps, comme il avient pour le *Nosema* ou *Glugea bombycis*, qui infecte chaque tissu et cavité de l'insecte hôte (*Bombyx mori*). Les spores enfin peuvent transmettre la maladie à de nouveaux hôtes.

Le cycle évolutif des *Cytoryctides* déduit par Calkins en observant les formations endocellulaires disséminées dans les différentes sections de pustules varioleuses et vacciniques, outres les nombreuses lacunes et incertitudes, apparaît à l'auteur même plutôt un travail de conjectures et analogies qu'une synthèse de faits concrets et démonstratifs. Malheureusement dans ces recherches nous devons toujours avoir présent la possibilité d'erreurs d'interprétation, dépendantes du matériel non recueilli en temps utile et des réagents fixateurs et de coloration.

Ainsi, il ne surprend pas si d'autres observateurs ont pu aussi récemment nier la nature parasitaire des corps de *Guarnieri* et des autres formes endo- et extracellulaires décrites en suite. Parmi ces études il faut prendre en considération spéciale les travaux de Mlle Foà et du Dr. Borrel.

Mlle Foà, dans une série d'expériences soignées, faites sous le contrôle du Prof. Grassi, établit ces deux points essentiels:

1) Que la virulence des produits de l'inoculation cornéale du vaccin n'est pas en rapport avec la présence et l'état de conservation des corps de *Guarnieri*.

2) Que pour beaucoup de conditions les *Cytoryctes* ne sont pas des êtres vivants, parasites du vaccin, sans exclure pourtant qu'ils puissent contenir les vrais parasites pas perceptibles avec nos moyens de recherches.

Mlle Foà fut induite à ces conclusions surtout par le fait que dans aucun cas, dans aucune phase en observant les corps de *Guarnieri* on peut démontrer la formation de cystes protectives, un fait qui se vérifie dans tous les protozoaires capables de résister à des changements d'ambiant et de survivre à une permanence dans un entourage défavorable, ni on peut rencontrer en eux des formes comparables aux spores durables des bactéries.

Borrel est encore plus décisif non seulement à nier la nature parasitaires des formes endo- et extracellulaires de la pustule varioleuse et vaccinique et des formes analogues rencontrées dans d'autres maladies (clavelée, aphte épizootique et cancer), mais il va jusqu'à croire que le procès de pustulation est le produit de la pénétration dans les cellules plus spécialement mésodermiques, des leucocytes polynucléaires qui y subissent des altérations régressives.

Des éléments semblables à ceux décrits par les différents observateurs comme des parasites spécifiques endo- ou extracellulaires de la pustule varioleuse ou vaccinique furent en suite signalés par Bosc, Borrel, Schottelius, Behla, Prana et Fiorentini, aussi dans la clavelée et dans l'aphte épizootique, et par moi dans ces maladies et la varicelle, où j'ai démontré les caractères différentiels des inclusions endocellulaires¹⁾.

1) Ma communication à la Société Italienne des Sciences Naturelles (6 Déc. 1908) sur la présence de formes semblables aux *Cytoryctes* dans les produits pathologiques des vésicules de la varicelle, vient d'être confirmée par les observations de Keysseltz et Mayer, Zur Aetiologie der Varicellen. (Arch. f. Protistenkunde. Bd. XIV. 1909.

La question sur la nature de tous ces virus était à ce point lorsque je commençai de nouvelles recherches que j'exposerai au but d'éclaircir la nature et l'origine des Cytoryctes dans leur phase initiale (gemmules de Calkins) lorsqu'ils sont encore libres dans le plasme, où ils furent relevés aussi des premiers observateurs sous forme de corpuscules brillants ronds ou légèrement ovales qu'on peut facilement confondre avec des gouttes de graisse ou avec les microcoques.

Matériel et technique.

Le matériel pour l'étude de la variole fut recueilli pendant deux épidémies qui ont eu lieu à Messine en 1896—1901, dans l'hôpital d'isolement de S. Sébastien à Rio de Janeiro (1899—1900), dans l'hôpital d'isolement de Milan (1903) et dans le Small-pox Hospital de Londres (1904), en suivant méthodiquement le développement de la pustule dans les cas cliniques les plus typiques de variole légère ou confluyente et hémorrhagique ou de purpura variolosa, dès le commencement des premiers symptômes jusqu'à la résolution du procès, en complétant les recherches avec des inoculations cutanées et cornéales dans les animaux.

Pour le vaccin j'ai suivi la même méthode, en examinant en séries les pustules dans les différentes phases de développement, utilisant un matériel très pur, contrôlé précédemment moyennant l'examen bactériologique et inoculé à des animaux les plus sensibles: bovidés de race hollandaise ou suisse et éventuellement à d'autres animaux (gazelle, cerf, daim) outre les animaux communs de laboratoire pour les inoculations cornéales.

Les observations ont été faites avec des préparations par écrasement ou avec des sections; et ayant noté que de toutes les méthodes de coloration jusqu'à maintenant indiquées par les différents auteurs qui m'ont précédé dans ces recherches, aucune ne correspondait au but de différencier exactement les formes éventuelles parasitaires des autres éléments multiples de la pustule, comme p. ex. les leucocytes et les corpuscules de pus et globules du sang plus ou moins altérés — j'ai suivi surtout la méthode de Romanowsky-Giemsa, que j'ai légèrement modifiée au but d'en rendre plus facile l'usage dans la coloration des tissus et éviter les précipitations d'éosine dans le champ de l'observation. Ainsi le résultat correspondait complètement à mes tentatives, comme chacun pourra vérifier des préparations que je tiens à disposition de ceux qui désirent contrôler ce que je suis en train d'exposer.

On peut du reste obtenir de bonnes préparations aussi avec les méthodes de Leishman et de Marino, mais avec celle de Giemsa les résultats sont toujours plus satisfaisants et sûres.

Il ne sera pas inutile de recommander que le matériel vaccinique pour contrôler mes expériences soit très pur et d'une virulence prononcée, si non, où les altérations initiales spécifiques seront vaincues et détruites par les procès inflammatoires provoqués par les bactéries pyogènes, ou dès le commencement au lieu d'avoir la réaction caractéristique de la vraie pustule, on aura la formation de la soi-disant pustula spuria des anciens, comme l'on observe dans toutes les autres lésions suppuratives de la peau. Pour mes expériences j'ai pour cela usé de préférence la Stam m lymph e de l'Institut vaccinogène Suisse de Berne, en contrôlant les résultats avec les lymphes vacciniques de beaucoup d'autres instituts:

p. 113.) Ces auteurs supposent que les corpuscules endocellulaires de la varicelle doivent se rapporter à des formes évolutives d'un parasite appartenant au genre *Clam ydozoa* (Prowazek).

Londres, Berlin, Gand, Utrecht, Rio Janeiro, Avana, Milan, Turin, Rome, Gênes etc.

Diagnose de formes nouvelles.

Dans l'exposition de ce que j'ai pu observer, je me rapporte surtout aux recherches faites avec le vaccin, le contrôle étant plus facile pour tous, en relevant qu'on observe des formations du même type dans la variole et la varicelle et dans les maladies semblables des animaux (clavelée des brebis, horse-pox, fièvre aphteuse).

En examinant la lymphé et la pulpe vaccinale ou de la pustule varioleuse aussi dans une période loin de la récolte (15^{me}—20^{me} jour et plus), prévu qu'elle soit conservée dans une glacière et légèrement délayée avec de la glycérine, on observe des éléments dans lesquels est encore visible la conformation cellulaire, formés d'une partie excentrique plus petite, légèrement teinte en bleu ou complètement sans couleur, et d'une masse ovale ou ronde colorée intensivement de rose par l'éosine avec tous les caractères de la réaction propre à la chromatine (fig. I).

Ces corps éosinophiles se présentent, dans l'intérieur, ordinairement granuleux ou nettement différenciés en corpuscules entassés en forme de mûre (morula); quelquefois allongés selon la configuration des éléments du tissu entourant, et dans un nombre variant dans les différentes couches de la pustule. Ils sont abondants et avec les granules ou les corpuscules bien définis et différemment disséminés autour à un point central d'origine commune, dans le matériel de préparation de la croûte et des parties molles et en décomposition de la pustule, moins abondants dans les parties profondes et latérales de l'excavation de la pustule où le tissu réagit avec un procès de réparation; très rares dans les brins de tissu connectif au-dessous du corps muqueux. Et dans ces dernières conditions seulement par exception on voit des formes avec des corpuscules disséminés autour du nucléus originaire; au lieu de cela on voit d'autres formes avec de la chromatine réunies en granules distincts ou pas encore bien différenciés et avec une masse protoplasmatique excentrique encore plus ou moins colorée de la couleur basique (nucléus?).

Ces corps éosinophiles mesurent de 5 à 15 μ , et quelquefois ils atteignent la grandeur des leucocytes éosinophiles: dans quelque rare cas il est possible d'en observer quelques-uns dans les cellules du corps muqueux et du stratum lucidum encore plus ou moins conservées (fig. II), et dans ce cas la masse chromatinique présente seulement une allusion à une différenciation en corpuscules. Les formes éosinophiles différenciées en corpuscules apparaissent au contraire presque toujours comme libres, mais de la distribution régulière à couches ou en surfaces dans les brins de tissu en observation, on comprend qu'ils faisaient part d'éléments cellulaires détruits ou qu'ils sont développés dans les espaces lymphatiques entre cellule et cellule (fig. III).

Les corpuscules qui se délivrent de ces masses chromatiques sont de différente grandeur entre 0,2—0,5 μ , rarement moins, et ont des contours bien définis, ronds et légèrement ovales (fig. I, II, III), et, colorés intensivement de rose ils se détachent du fond bleu de la préparation en se différenciant de toutes les autres formes bactériques semblables (micrococques pyogènes et streptococques) qui, du reste, ne sont pas colorables par l'éosine.

La méthode Romanowsky-Giemsa présente pour ces éléments de la pulpe varioleuse et vaccinale la même réaction élective spécifique

comme pour les parasites de la malaria et les corps endocellulaires de la rage (corps de Negri).

* * *

Qu'est-ce que sont ces corps spécifiques de la pustule varioleuse et vaccinique et d'autres lésions semblables de l'homme et des animaux?

Si nous devons les ramener au leucocytes et granulations éosinophiles, la question ne perd point d'importance, puisque toutes les formes jusqu'à maintenant considérées par les différents observateurs comme des phases évolutives de sporozoaires parasites de ces maladies, doivent être reconduites aux éléments éosinophiles que je viens de décrire.

L'augmentation des leucocytes éosinophiles dans le sang et leur intervention dans certaines altérations déterminées des tissus avec la formation de nodules, furent récemment par beaucoup d'observateurs démontrées chez les animaux en relation avec la présence de zoo-parasites et comme conséquence de leurs produits toxiques. Les leucocytes éosinophiles, selon Metchnikoff, auraient la fonction de détruire les poisons produits par les zoo-parasites, moyennant l'élimination d'antitoxines engendrées par les granulations, qui se forment dans le cytoplasme des leucocytes acidophiles, pendant les différentes phases du procès phagocytaire.

Est-ce que dans les manifestations pustuleuses et vésiculaires du groupe des maladies en question se vérifie le même fait? Je dois tout de suite dire que, si même il s'agit d'une infiltration de leucocytes éosinophiles et de leurs produits régressifs, les granulations et corpuscules que l'on observe dans les procès pathologiques de la variole, du vaccin, de la varicelle, de la fièvre aphtheuse et de la clavelée, sont par plusieurs caractères bien différentes de celles qu'on voit dans les lésions déterminées par les zoo-parasites — avant tout par la forme plus petite et mieux définie des granules, et par la réaction moins intense aux couleurs électives.

Pour définir la question déjà pour elle-même très intéressante puisque personne jusqu'à maintenant n'a établi que le procès de pustulation dans la variole et le vaccin est caractérisé au commencement d'une leucocytose par éosinophiles — j'ai pensé de suivre avec des observations méthodiques le développement de la pustule dès le commencement et dans les phases successives jusqu'à la réparation du tissu par guérison spontanée: et voilà ce que j'ai pu observer dans les préparations.

Déjà peu d'heures (8—12) après l'inoculation cutanée, mais plus facilement sur la cornée des animaux sensibles au virus varioleux et vaccinique, on relève dans et hors de la cellule épithéliale des corpuscules ronds ou ovales, colorés de violet uniforme ou de rose pâle, dans le centre et avec des points différenciés à la périphérie en forme annulaire ou en granules d'une substance qui réagit vivement en rose avec l'éosine Romanowsky-Giemsa (Pl. I, fig. I, 1—8; fig. II, 1—16). Quelques autres de ces corpuscules présentent au contraire dans l'intérieur de la masse colorée de violet une agglomération de substances chromatiques différemment configurées et plus souvent en forme de manivelle comme dans les formes d'accroissement des throphozoites protozoaires (Pl. I, fig. II, 10, 11, 16).

Plus tard (24 h.) les formes dans les cellules deviennent moins manifestes parce que le protoplasme cellulaire se trouble en empêchant ainsi une définition nette de la réaction colorante dans les différentes parties du corpuscule endocellulaire, mais dans quelques cellules il est toujours possible de voir le corpuscule avec une masse le plus souvent

excentrique qui réagit en violet ou bleu pâle au réactif de Giemsa, et à côté toujours plus agrandie en comparaison avec les formes décrites précédemment, une masse intensivement rose avec des bandes ou granulations radiales et concentriques d'une couleur rouge vif (Pl. I, fig. II, 8, 9, 10, 13). Dans les éléments extracellulaires, du reste entièrement semblables à ceux contenus dans les cellules, il est plus facile de relever les métamorphoses ultérieures. Ils apparaissent maintenant comme des corps constitués d'une partie ronde ou ovale ordinairement poussée à l'extérieur comme un pseudopode, colorée de bleu et autour de celle-ci en forme de tête de clou se dispose la partie chromatinique d'un double volume de l'autre, d'abord colorée uniformément de rose et plus tard (36—48 h.) différenciée en diverse manière avec des masses de chromatine d'une coloration plus intensive (Pl. I, fig. I, 1—10).

Toutes ces formes apparaissent et sont visibles déjà pour bien des heures dans le champ de l'inoculation ou dans les pustules d'un développement spontané (variole), lorsque aucun autre élément du sang ou de la lymphe est encore intervenu à déterminer le procès inflammatoire. Et encore au 3^e—4^e jour, si le matériel d'inoculation est amicrobique au presque, les éléments pathologiques de la pustule initiale sont exclusivement représentés par les formes que je viens de décrire, et seulement plus tard les lymphocytes interviennent et après eux les leucocytes polynucléés.

Que l'apparition de ces formes soit directement liée au matériel d'inoculation, on relève du fait que dans les pustules expérimentelles le procès se déploie en manière centripète avec une diminution graduelle de ces éléments de l'extérieur à l'intérieur dans les différentes couches de la pustule; dans la variole spontanée au contraire, ou dans le vaccin produit par infection par voie gastrique ou endoveneuse, ces éléments spécifiques se trouvent plus abondants dans les couches profondes du chorion sur les papilles, et graduellement moins nombreux dans les couches plus superficielles, lorsque la pustule se trouve dans la phase initiale et le procès n'a pas encore atteint les couches plus externes, comme il aient dans la période nommée de maturation.

Un autre fait qui démontre la spécificité de ces éléments par rapport au virus varioleux et vaccinale est la réduction graduelle de leur nombre et l'altération de leurs caractères morphologiques lorsque avec la présence de bactéries pyogènes le procès inflammatoire dès le commencement compromet le développement normale de la pustule ce qu'on relève de l'intervention rapide des phagocytes attirés sur lieu de l'action chemiotactique des produits bactériens.

A partir du 3^e jour lorsque l'accès de la fièvre vaccinale commence à se manifester, on observe dans la pustule des modifications macroscopiques et microscopiques très remarquables. La vésicule constituée du soulèvement de l'épiderme au-dessus du stratum lucidum d'Oehl et de la collection de sérum limpide, agrandit rapidement en peu d'heures tandis que la tension interne augmente avec l'épaississement du liquide qui devient laiteux à cause du détachement et de la décomposition d'éléments auparavant fixés exclusivement dans le fond de la pustule, c'est à dire dans les corps muqueux et dans la couche brillante.

Si l'on examine en ce moment sous le microscope le contenu plus

ou moins laiteux de la pustule en suivant le phénomène d'heure en heure, on observe :

a) Lorsque la lymphe commence à peine à se troubler les éléments spécifiques présentent la masse chromatique recueillie en forme de boule avec un indice caractéristique à ségmentation (phase de morula) et à côté une masse résiduelle légèrement teinte en bleu et à peine visible ou déjà disparue (Pl. I, fig. I, 9, 10).

b) En suite en s'accroissant le troublement de la lymphe, les corps spécifiques présentent une ségmentation typique de la masse chromatinique avec des subdivisions en corpuscules ronds et ovales, très petits, ordinairement toujours plus nombreux de la centaine, recueillis en masse comme un sporange.

c) Plus tard on voit dans la lymphe observée fraîche les masses se rompre spontanément avec diffusion dans le champ microscopique des globules entièrement semblables aux spores de sporozoaires. Dans les préparations colorées l'aspect de ces formes offre quelque chose de surprenant. Au milieu de petites nues constituées de corpuscules disséminés partout irrégulièrement dans le champ d'observation, on remarque ici et là surtout en correspondance des résidus de tissu, des colonies à pavé qui rappellent quant à la conformation et position les cellules épithéliales préexistantes desquelles reste seulement le détritux pas coloré.

Ces colonies sont constituées par les corpuscules disposés en manière radiale autour à un point centrale ordinairement vide ou avec des résidus du nucléus peu ou point du tout colorables (Pl. I, fig. I, 11; fig. II, 23, 24).

d) Les corpuscules ont de très petites dimensions variables entre 0,2—0,5 μ ou peu de plus, sont différenciables exclusivement avec les réactifs de Romanowsky-Giemsa, Leishman et Marino, en se colorant électivement avec l'éosine, et ne présentant pas de partie nucléaire. En examinant avec attention et avec un agrandissement convenable on relève que ces corpuscules (aussi les plus petits) ont une forme égale aux spores des hémospores (*Laverania malariae* Gras. et Fil.), c'est à dire qu'ils sont aplatis dans le centre tandis que la chromatine se recueille à la périphérie souvent en forme d'anneau. Observés dans le matériel frais, ils présentent un protoplasme réfractant avec une partie centrale ponctuée obscure, et il paraît qu'ils possèdent des mouvements améboides très vifs.

e) Pendant que ces modifications aient dans les éléments libres de la lymphe, sans les cellules du corps muqueux limitées à la partie plus centrale des pustules, on observe toutes les formations indiquées par les figures. Au commencement représentées par des corpuscules (Cytoryctes) installés dans le cytoplasme, et après dans le nucléus; et en suite des formes où la chromatine apparaît distribuée dans une espèce de reticulum chromidiale, semblable à celui des spores des certains myxosporidies (Pl. I, fig. II, 17—22).

De mes observations qui offrent des méthodes faciles de contrôle, résulte que la formation de la pustule varioleuse et vaccinale comme aussi l'exanthème d'autres maladies semblables de l'homme et des animaux (varicelle, la clavelée, fièvre aphteuse) sont accompagnés d'un procès de développement et de multiplication d'éléments spécifiques installés entre et dans les cellules du corps muqueux et de la couche brillante, qui présentent dans quelques phases des caractères morphologiques très semblables au leucocytes éosinophiles.

Si même nous devons considérer les formes libres dans la lymphe

et les tissus comme des leucocytes éosinophiles, évidemment dans les lésions pathologiques en question ils s'engendrent in situ au moyen de formes qui à l'état initial ne peuvent pas se différencier des lymphocytes, et seulement dans les phases ultérieures apparaît une partie éosinophile, qui en suite se différencie en corpuscules et granulations, pendant que le nucléus, au commencement unique, se sépare en deux ou plusieurs parties.

Contre l'opinion qu'il s'agit d'une simple migration de leucocytes éosinophiles et de leurs phases régressives, il y a les faits suivants:

a) Dans l'inoculation cutanée l'immigration devrait venir des parties profondes, tandis que nous voyons les formes plus nombreuses et caractéristiques dans les couches superficielles de la pustule.

b) Les leucocytes éosinophiles n'ont pas de pouvoir phagocytaire, et en cas qu'on veuille d'une autre manière expliquer leur action défensive dans le point d'inoculation, l'intensité de l'immigration devrait être en rapport direct avec l'immunité de l'animal: tandis que les animaux moins susceptibles ne présentent pas la réaction de la pustule, ni la présence des corps éosinophiles.

c) Dans les animaux sensibles pendant l'inoculation cutanée on devrait avoir d'abord une hyperleucocytose par éosinophiles dans le sang, puis dans les pustules, tandis que tout le contraire a lieu. Si, par contre, l'inoculation du virus est faite par voie orale ou endovéneuse, on observe une augmentation d'éosinophiles dans le sang seulement après des localisations très graves dans la moelle des os et dans l'épithèle de la muqueuse intestinale.

d) La différenciation de la chromatine en corpuscules dans les points de localisation correspond aussi, quant à l'intensité, à l'accès fébrile (fièvre vaccinale) de la même manière comme il se vérifie dans la sporulation des hémospores (loi de Golgi).

e) Les corpuscules ont une configuration bien définie et constante tout comme leur distribution dans le champ de la cellule de laquelle ils ont l'origine, et conservent la réaction élective encore après que tous les autres éléments du tissu sont complètement altérés et pas reconnaissables.

En examinant en séries le produit des pustules dans les diverses phases à partir du 5^e—7^e jour, on observe que des couches plus superficielles et graduellement jusqu'aux plus profondes l'affinité pour la couleur élective diminue rapidement dans les corpuscules éosinophiles jusqu'à ce qu'ils apparaissent des granules de pigment cutané coloré de vert olive (fig. VI), mais en conservant toujours leur caractères morphologiques et leur position dans les tissus, de manière que l'œil exercé peut facilement les reconnaître et différencier. Quelquefois même ils semblent plus agrandis: on dirait que dans cette phase ils revêtent une capsule qui les protège des agents extérieurs dans les débris de la pustule destinés à se détacher, et pour cela la couleur élective ne peut pas pénétrer et se fixer dans le protoplasme à réaction chromatinique. Ceux qui restent dans le tissu de la pustule en voie de cicatriser y passent par une phase régressive en se transformant en des granules bruns et noirs, qui constituent le pigment caractéristique des cicatrices varioleuses et vaccinales, l'absorption duquel est très lent et dure des mois après la guérison de la lésion pustuleuse.

En continuant les recherches sur la nature de ces corpuscules et leur rapport avec la virulence du matériel éliminé avec les croûtes ou la pulpe des pustules, j'ai pu observer quelques faits très intéressants que je veux ici brièvement exposer.

a) Si l'on filtre à travers des chandelles normales de Chamberland et Berkefeld la lymphe varioleuse et vaccinale, recueillie lorsque les granulations éosinophiles apparaissent dans la pustule, et en centrifugant le filtré, on obtient de celui-ci des préparations dans lesquelles on peut facilement démontrer la présence de petites granulations éosinophiles, et l'inoculation cornéale dans ces cas est constamment positive. Si la préparation du résidu est riche de ces granules, le développement dans l'inoculation cornéale aient aussi sans recourir à la méthode ingénieuse de Negri, c'est à dire sans mettre à contact avec la cornée blessée du coton ou de la gaze imprégné du liquide de preuve, pour éviter que les larmes emportent rapidement la petite quantité de virus filtré.

Si au contraire on fait la filtration avec des chandelles moins perméables jusqu'à celles de porcelaine, de manière d'exclure sûrement dans le filtré la présence des corpuscules éosinophiles, l'inoculation cornéale ou cutanée résulte négative et la formation de la pustule n'a pas lieu.

On relève de ces expériences que l'action spécifique de la lymphe vaccinale et varioleuse est intimement liée à la présence des corpuscules éosinophiles.

Lorsque le matériel à filtrer est recueilli de pustules en voie de regression (12^e—15^e jour), et si dans les préparations on voit au lieu des formes à réaction éosinophile, des nuées de corpuscules à réaction vert olive (fig. X), le filtré est constamment libre de corpuscules aussi en usant les chandelles normales, et, tandis que le matériel est actif, le filtré ne l'est plus.

Mais dans cette phase il est évident que les contours des corpuscules deviennent rigides, ce qui probablement empêche le passage à travers les pores des filtres comme il aient des bactéries. Dans la phase initiale (disons de plasmodies) la flexibilité et l'élasticité du protoplasme, comme on peut comprendre des diverses formes prises dans les préparations colorées permettent plus facilement leur passage à travers les filtres.

b) Ces corpuscules ou granulations éosinophiles manifestent une résistance extraordinaire non seulement contre l'action des agents externes dans les détritiques du matériel éliminé par l'ulcération de pustules, mais aussi à l'action digestive de certains insectes qui infestent les animaux malades. Ainsi p. ex. ils sont digérés ensemble avec tous les autres éléments du sang et du pus par des insectes hématophages comme les tabanides, les tiques etc., tandis qu'ils résistent et sont longtemps visibles dans le tube digestif d'autres insectes (Stomoxys, mouches) dans lesquelles on les rencontre souvent parfaitement conservés encore plusieurs jours après le dernier repas; quelquefois installés dans les cellules de l'épithèle de l'estomac sucoir, avec des caractères morphologiques différents, parce qu'ils présentent ordinairement une diminution de corpuscules autour des nucléi, qui apparaissent plus marqués dans la coloration. En présence de ces corpuscules le contenu intestinal des insectes hôtes infectés, possède une virulence accentuée en produisant la pustule vaccinale ou varioleuse.

De ces observations on doit conclure que les corpuscules ne représentent pas seulement des produits régressifs du tissu, et que au lieu de atténuer les virus de

la variole et du vaccin, ils concourent à conserver leur activité infectante.

Les expériences de contrôle au but de voir si l'on pouvait obtenir avec d'autres produits pathologiques (pus de différente nature, bactéries, toxines et protéines bactériques etc.) ou avec des substances chimiques irritantes les tissus (térébenthine, huile de croton, cantharides, alcali et acides organiques et minéraux etc.) des formes semblables à celles maintenant décrites comme spécifiques de la pustule vaccinale et variolense, conduisirent à des résultats négatifs, excepté les produits virulents de la fièvre aphtheuse, virus claveleux, varicelle desquels je référerai en suite.

Conclusions.

Les formes nouvelles que je viens de décrire en quel rapport se trouvent-elles avec celles décrites par les auteurs précédents? Evidemment les Cytoryctes de Guarnieri ont origine des corpuscules éosinophiles puisque déjà 5—10 heures après l'inoculation de la lymphé dans l'animal sensible, au lieu des formes avancées des corpuscules éosinophiles colorés de vert olive et de vert foncé, nous trouvons diffus dans le champ des corpuscules plus gros, d'un diamètre de 0,5—1,5 μ , les plus petits d'une couleur violacée dans lesquels on remarque moyennant la coloration une composition uniforme de deux substances protoplasmiques: l'une à réaction éosinophile, l'autre à réaction basophile. Les corpuscules plus gros présentent déjà une différenciation de la chromatine qui se recueille en agglomérations ou en bandes ou en massue en conformation diverse dans la partie basophile ou en forme d'anneau à la périphérie de celle-ci. Nous voyons plus tard les mêmes formes dans les cellules des couches plus profondes de l'épiderme et dans le corps muqueux, jusqu'à ce qu'ils prennent des formes semblables à celles des leucocytes éosinophiles d'abord à chromatine plus ou moins recueillie et pas différenciée, et avec un nucléus évident; en suite avec la chromatine différenciée en corpuscules et avec un nucléus à peine visible, peu colorable ou déjà disparu. On peut mieux démontrer ces phases de transformation des Cytoryctes de Guarnieri dans l'épithèle intestinal (de l'iléon) lorsque les animaux sont infectés par la voie gastrique ou endovéneuse.

Toutes les autres formes décrites par les différents auteurs comme des phases ultérieures des Cytoryctes jusqu'à la sporulation, surtout par Ishigami, Councilman, Magarth, Brinkerhoff et Calkins doivent se référer aux mêmes formes que j'ai maintenant mieux définies et précisées, avec une méthode de recherche et de coloration qui ne laisse pas de doute sur leur nature.

La grande ressemblance dans quelques phases de développement de ces formes avec les leucocytes éosinophiles laisse toujours une incertitude pour un jugement définitif auquel j'espère de pouvoir arriver avec des recherches ultérieures. Mais la supposition qu'il s'agit de parasites est plus que justifiée du fait que toutes les formes initiales du cycle évolutif d'autres protozoaires parasites d'espèces semblables comme les Myxobolides et Glugéides, bien qu'ils soient d'une organisation plus complexe, présentent dans la phase de trophozoites „eine merkwürdige Aehnlichkeit“ avec les leucocytes (Doflein).

Ce qui est sûr est que la variole et le vaccin comme d'autres infections semblables (varicelle, virus claveleux et aphthe épizootique)

sont accompagnés de la présence d'éléments éosinophiles qui accomplissent dans des tissus déterminés des phases évolutives ou régressives bien caractérisées, le résultat desquelles est la production de corpuscules semblables à des spores engendrées par la partie chromatinique des corps en question. Ces corpuscules se forment pendant la crise du procès pathologique et „essaient“ (selon l'expression de Doflein pour les spores des microsporidies) en se répandant dans les tissus, où ils restent visibles jusqu'à ce que les produits de la lésion sont virulents.

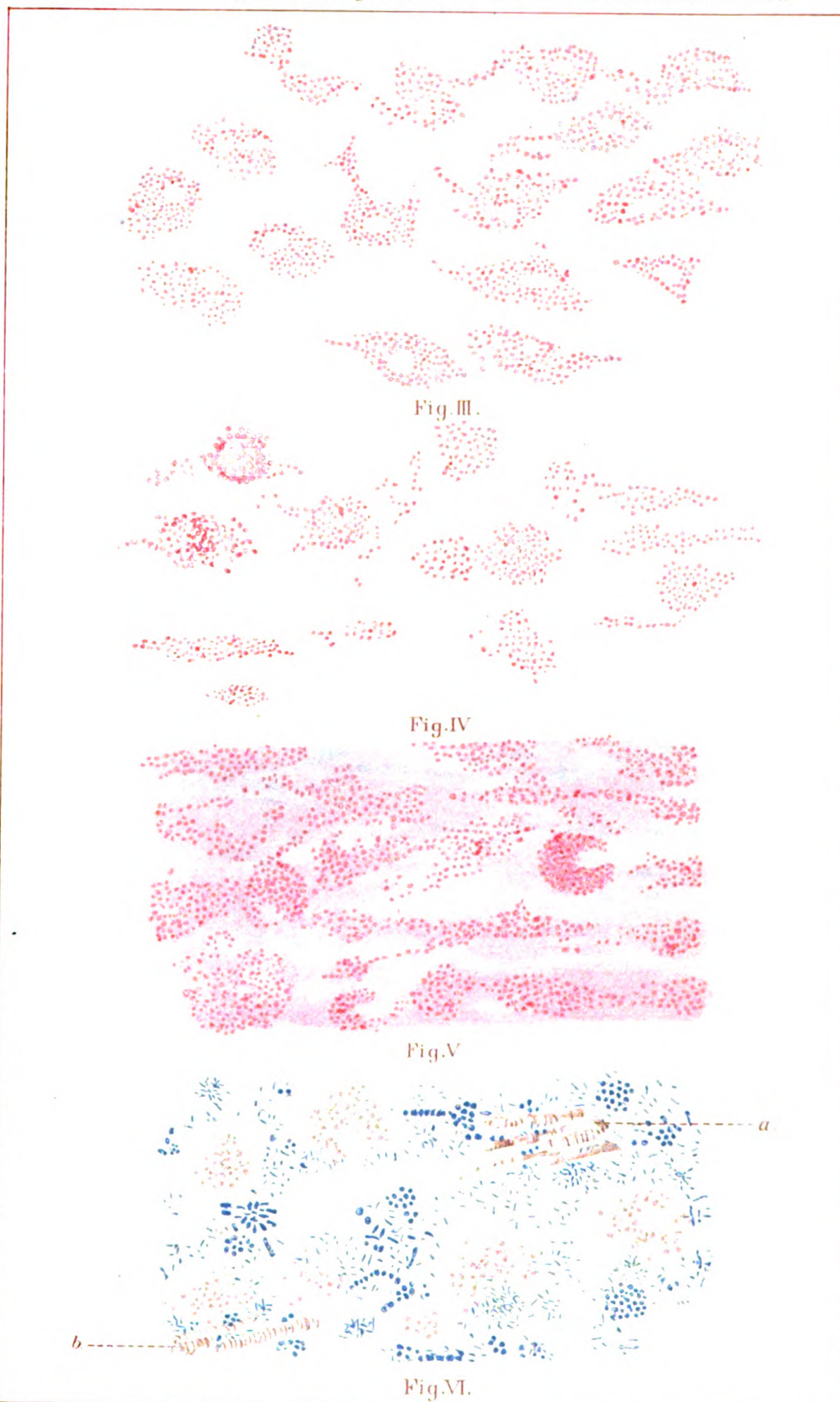
Le rapport entre la présence de ces formations éosinophiles et l'activité spécifique du vaccin de Jenner et de la lymphé variolense est tel, que de la quantité et qualité des mêmes nous pouvons arguer l'intensité infectante de ces virus. En effet dans les manifestations plus graves de la variole confluente et hémorrhagique, toute la peau et la muqueuse intestinale (de l'ileum surtout) et la moelle rouge des os résultent disséminée de corpuscules éosinophiles, tandis que dans les formes légères ils sont limités dans le champ de chaque pustule. Et aussi dans la vaccination ils sont l'indice pour juger si l'évolution de la pustule est normale, et par conséquent si le résultat de l'inoculation sera efficace. Cette observation sera donc ensuite le contrôle positif de la vaccination jennérienne, puisque si la lymphé est impure et la virulence est déficiente, nous voyons les corps éosinophiles diminuer jusqu'à disparaître complètement, et avec l'intervention des bactéries change entièrement le résultat histologique de la lymphé où prévalent les corpuscules de pus et les leucocytes polynuclés, neutrophiles et basophiles.

Milano, Decembre 1908.

Littérature.

- Golgi, C., Sulle modificazioni del midollo delle ossa nel vaiuolo. (Rivista Clinica 1873, et aussi: Opera omnia.) Milano (U. Hoepli) 1903. p. 855.
 Hallier, cité par Golgi.
 Cornil, Sur l'histologie des pustules de la variole hémorrhagique. (L'union méd. Série III. T. XXVIII. 1879. p. 795.)
 Pfeiffer, L., Ein neuer Parasit der Pockenprozesse aus der Gattung Sporozoa [Leuckart]. (Monatsschr. f. prakt. Dermat. Bd. IV. 1887. p. 435.)
 —, Das Vorkommen der Marchiafava'schen Plasmodien im Blute von Vaccinierten und von Scharlachkranken. (Zeitschr. f. Hyg. Bd. II. 1887. p. 397.)
 Van der Loeff, A., Ueber Proteiden in dem animalischen Impfstoffe. (Monatsschr. f. prakt. Dermat. Bd. IV. 1887. p. 189.)
 —, Ueber Proteiden oder Amöben bei Variola vera. (Monatsschr. f. prakt. Dermat. Bd. IV. 1887. p. 447.)
 Pfeiffer, L., Weitere Untersuchungen über Parasiten im Blute und in der Lymphé bei den Pockenprozessen. (Korrespondenzbl. d. allg. ärztl. Vereins f. Thüringen. 1888. No. 11. Sep.-A., zit. Baumgartens Jahresb. Bd. IV. 1888. p. 316.)
 Guarnieri, G., Ricerche sulla patogenesi ed etiologia dell'infezione vaccinica e variolosa. (Arch. p. le scienze med. Vol. XXVI. 1892. p. 403.)
 Monti, A., Sui protozoi del vaiuolo e del vaccino etc. (Rendiconti d. Società med.-chirurg. di Pavia. 1893. Aprile.)
 Guarnieri, G., Ueber die Parasiten der Variola und der Vaccine. (Centralbl. f. Bakt. etc. Bd. XVI. 1894. p. 299.)
 Monti, A., Ueber Aetiologie der Pocken etc. (Berl. klin. Wochenschr. 1894.)
 Piana, G. P. et Galli-Valerio, Sulla morfologia dei parassiti del vaiuolo umano. (Centralbl. f. Bakt. etc. Bd. XVII. 1894. p. 260.)
 Thélohan, P., Recherches sur les Myxosporidies. (Bull. scient. de la France et de la Belgique. T. XXVI. 1895. p. 100—394.)
 Guarnieri, G., Ulteriori ricerche sulla etiologia e patogenesi della infezione vaccinica (Clin. med. Pisa. Vol. III. 1897. p. 57.)

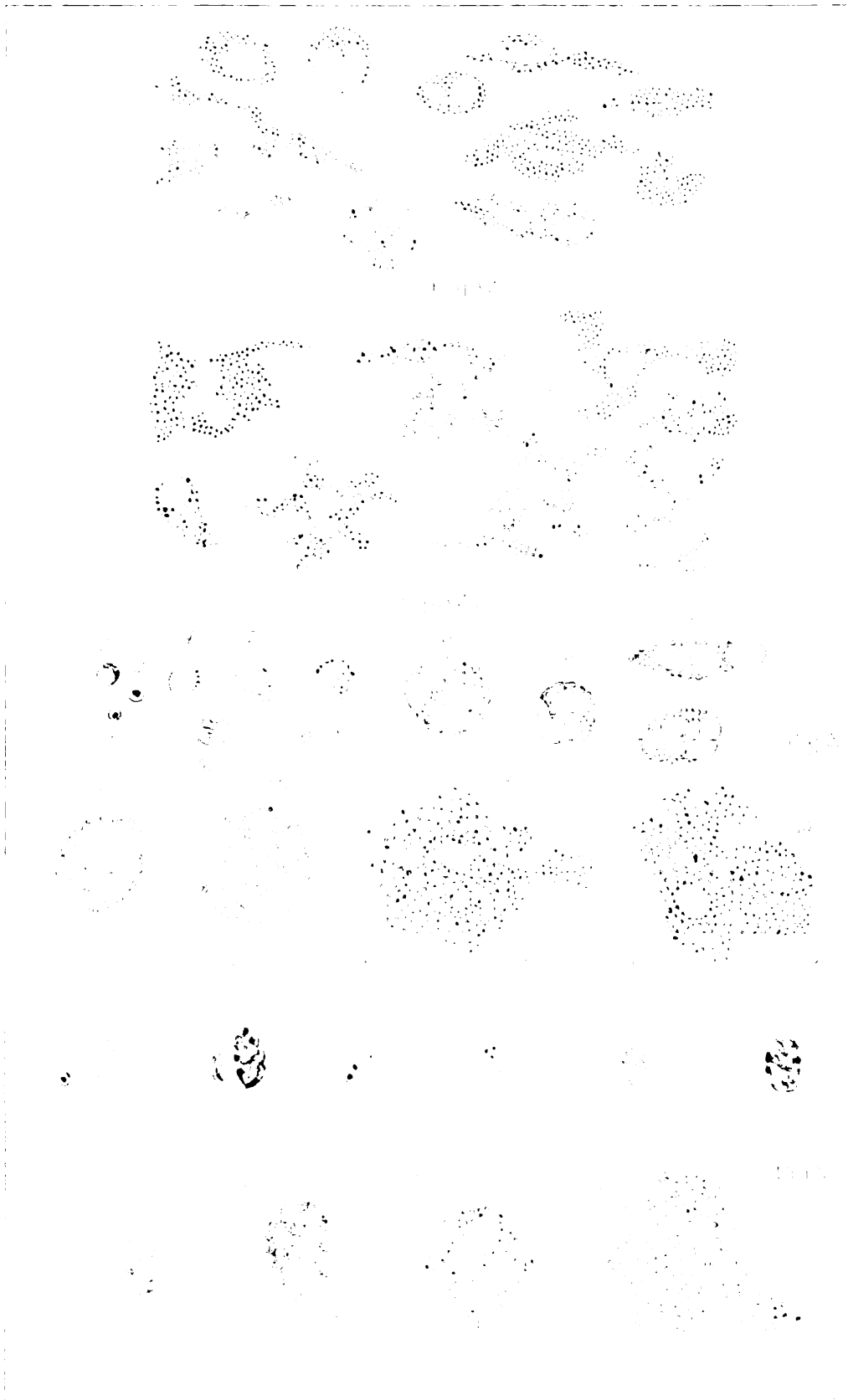
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120	121	122	123	124	125	126	127	128	129	130	131	132	133	134	135	136	137	138	139	140	141	142	143	144	145	146	147	148	149	150	151	152	153	154	155	156	157	158	159	160	161	162	163	164	165	166	167	168	169	170	171	172	173	174	175	176	177	178	179	180	181	182	183	184	185	186	187	188	189	190	191	192	193	194	195	196	197	198	199	200	201	202	203	204	205	206	207	208	209	210	211	212	213	214	215	216	217	218	219	220	221	222	223	224	225	226	227	228	229	230	231	232	233	234	235	236	237	238	239	240	241	242	243	244	245	246	247	248	249	250	251	252	253	254	255	256	257	258	259	260	261	262	263	264	265	266	267	268	269	270	271	272	273	274	275	276	277	278	279	280	281	282	283	284	285	286	287	288	289	290	291	292	293	294	295	296	297	298	299	300	301	302	303	304	305	306	307	308	309	310	311	312	313	314	315	316	317	318	319	320	321	322	323	324	325	326	327	328	329	330	331	332	333	334	335	336	337	338	339	340	341	342	343	344	345	346	347	348	349	350	351	352	353	354	355	356	357	358	359	360	361	362	363	364	365	366	367	368	369	370	371	372	373	374	375	376	377	378	379	380	381	382	383	384	385	386	387	388	389	390	391	392	393	394	395	396	397	398	399	400	401	402	403	404	405	406	407	408	409	410	411	412	413	414	415	416	417	418	419	420	421	422	423	424	425	426	427	428	429	430	431	432	433	434	435	436	437	438	439	440	441	442	443	444	445	446	447	448	449	450	451	452	453	454	455	456	457	458	459	460	461	462	463	464	465	466	467	468	469	470	471	472	473	474	475	476	477	478	479	480	481	482	483	484	485	486	487	488	489	490	491	492	493	494	495	496	497	498	499	500	501	502	503	504	505	506	507	508	509	510	511	512	513	514	515	516	517	518	519	520	521	522	523	524	525	526	527	528	529	530	531	532	533	534	535	536	537	538	539	540	541	542	543	544	545	546	547	548	549	550	551	552	553	554	555	556	557	558	559	560	561	562	563	564	565	566	567	568	569	570	571	572	573	574	575	576	577	578	579	580	581	582	583	584	585	586	587	588	589	590	591	592	593	594	595	596	597	598	599	600	601	602	603	604	605	606	607	608	609	610	611	612	613	614	615	616	617	618	619	620	621	622	623	624	625	626	627	628	629	630	631	632	633	634	635	636	637	638	639	640	641	642	643	644	645	646	647	648	649	650	651	652	653	654	655	656	657	658	659	660	661	662	663	664	665	666	667	668	669	670	671	672	673	674	675	676	677	678	679	680	681	682	683	684	685	686	687	688	689	690	691	692	693	694	695	696	697	698	699	700	701	702	703	704	705	706	707	708	709	710	711	712	713	714	715	716	717	718	719	720	721	722	723	724	725	726	727	728	729	730	731	732	733	734	735	736	737	738	739	740	741	742	743	744	745	746	747	748	749	750	751	752	753	754	755	756	757	758	759	760	761	762	763	764	765	766	767	768	769	770	771	772	773	774	775	776	777	778	779	780	781	782	783	784	785	786	787	788	789	790	791	792	793	794	795	796	797	798	799	800	801	802	803	804	805	806	807	808	809	810	811	812	813	814	815	816	817	818	819	820	821	822	823	824	825	826	827	828	829	830	831	832	833	834	835	836	837	838	839	840	841	842	843	844	845	846	847	848	849	850	851	852	853	854	855	856	857	858	859	860	861	862	863	864	865	866	867	868	869	870	871	872	873	874	875	876	877	878	879	880	881	882	883	884	885	886	887	888	889	890	891	892	893	894	895	896	897	898	899	900	901	902	903	904	905	906	907	908	909	910	911	912	913	914	915	916	917	918	919	920	921	922	923	924	925	926	927	928	929	930	931	932	933	934	935	936	937	938	939	940	941	942	943	944	945	946	947	948	949	950	951	952	953	954	955	956	957	958	959	960	961	962	963	964	965	966	967	968	969	970	971	972	973	974	975	976	977	978	979	980	981	982	983	984	985	986	987	988	989	990	991	992	993	994	995	996	997	998	999	1000
---	---	---	---	---	---	---	---	---	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	------



Form. q. z.

Fig. von Gustav Fischer in Bonn

Dr. W. S. L. H. J. 1913



- v. Wasielewski, Ueber die Form und Färbbarkeit der Zelleinschlüsse bei Vaccineimpfungen. (Centralbl. f. Bakt. etc. Bd. XXI. 1897. p. 901.)
- Doilein, Fr., Studien zur Naturgeschichte der Protozoen. III. Ueber Myxosporidien. (Zool. Jahrb. [Anat.] Bd. II. 1898. p. 281—346.)
- Hükel, A., Die Vaccinekörperchen. (Beitr. zur path. Anat. Bd. XXV. 1898. Suppl.-Heft.)
- Calkins, G. H., Lymphosporidium trotae etc. (Zool. Anz. Bd. XXIII. 1900. p. 513—520.)
- Calkins, G. H., The Sporozoa. New York (Macmillan Co.) 1901.
- Bosc, F. J., Les maladies à sporozoaires. La vaccine, la clavelée, le cancer. (Arch. de méd. expér. T. XIII. 1901. p. 253.)
- Metschnikoff, E., Bull. de l'Acad. de méd. de Paris. 1901. p. 301.
- Borrel, A., Expériences sur la filtration du virus claveleux. (Compt. rend. soc. biol. 1902. p. 59.)
- Stempel, W., Ueber Thelohania Mülleri. (Zool. Jahrb. [Anat.] Bd. XVII. 1902.)
- Ishigami, T., Ueber die Natur des Vaccine- resp. Variolaerregers. (Centralbl. f. Bakt. etc. Abt. I. Orig. Bd. XXXI. 1902. p. 794.)
- Borrel, A., Epithélioses infectieuses et épithéliomas. (Ann. de l'Inst. Pasteur. T. XVII. 1903. p. 81.)
- Minchin, E. A., Sporozoa. (Lankester, Treatise on zoology. Part I. Fasc. 2. London [F. & C. Churchill] 1903.)
- Stempel, W., Ueber Nosema anomalum Monz. (Arch. f. Protistenkunde. Bd. IV. 1904. p. 1—42.)
- Councilman, W. T., Magarath, G. B., Brinkerhoff, W. R., Tyzzer, E. E., Southard, E., Thompson, R. L., Bancroft, J. R., Calkins, G. H., Studies on the pathology and on the etiology of Variola and of Vaccinia. (The Journ. of Medical Research. Vol. XI. 1904. p. 1—359.)

Explication des tables¹⁾.

Table I.

Fig. I. 1—6 formes éosinophiles libres extra-cellulaires, 18—24 heures après l'inoculation du virus varioleux ou du vaccin; 7—8 après 36 h.; 9—10 formes à morula; 11 migration des corpuscules.

Fig. II. 1—24 formes endocellulaires des premières heures de l'inoculation jusqu'à la formation des corpuscules ou spores.

Table II.

Fig. III. Morceaux du [Stratum germinativum d'une pustule vaccinale au 3^{me} à 5^{me} jour de l'inoculation.

Fig. IV. Id. du même tissu d'une pustule de variola vera au 3^{me}—4^{me} jour de l'éruption.

Fig. V. Id. du même tissu dans un cas de purpura hémorrhagica au 2^{me} jour.

Fig. VI. Croûte d'une pustule vaccinale au 10^{me}—15^{me} jour après l'inoculation. Les corpuscules ne sont presque pas colorables par l'éosine, et présentent une couleur vert olive comme des granules de pigment ou d'impuretés. Les bactéries restent colorées de bleu foncé par la couleur basique (azur de Giemsa). *a* et *b* sont des détritux des tissus végétaux.

Table III.

Fig. VII. Les mêmes formations dans la fièvre aphtheuse. Détritux du corps muqueux, au 3^{me} jour de l'éruption.

Fig. VIII. Id. id. dans les détritux d'une vésicule de varicelle au 2^{me} jour après l'éruption. Plus tard on voit, comme aussi dans la fièvre aphtheuse, les mêmes formes colorables selon la fig. VI. Les corps éosinophiles de la varicelle présentent toujours une partie centrale basophile bien distinguée, et prennent dans le tissu un aspect semblable aux chromatophores des vertébrés inférieurs. Avec le virus de la clavelée on a des formes très semblables à celles de la varicelle.

Fig. IX. Rôle évolutif des formations éosinophiles extracellulaires dans la première phase de la pustule (1—8), dans la période de germination (10—13), et (14—16) dans la période aiguë de la pustulation. 9 forme de la même période dans la varicelle.

Fig. X. Rôle évolutif intracellulaire. 1—3 formes initiales; 5—8 formes de la période prépustulaire; 8—10 dans la crise.

1) Toutes les figures sont dessinées avec la chambre lucide de Nachet (Object. mm Ap. apochr. Imm. homog. Ocul. XII—XVIII compens. Koristka).

von Prowazek angezeigten Formen auf die oben erwähnten körnigen Gebilde zurückgeführt werden können. Wenn man mit Giemsa's Flüssigkeit gefärbte Trachompräparate untersucht, so findet man in zahlreichen Zellen violett gefärbte Massen, welche den von uns in Präparaten von Makakotrachom beschriebenen sehr ähneln.

Wahrscheinlich entsprechen diese Gebilde gewissen Formen, welche Prowazek beschrieben und als Produkte gewisser Perioden der zyklischen Parasiteninvasion und als plastinische Ueberbleibsel des Körpers gedeutet hat, in welchen sich die Parasiten befanden.

Hier wollen wir folgendes hervorheben:

1) Die unbestimmten, verwobenen, komplexen, bald gewölbten, bald länglichen Gebilde, welche man in den Epithelzellen der trachomatösen Bindehaut beobachtet, sind unbedingt nicht spezifisch; dieselben differenzieren sich deutlich von denjenigen, welche wir als granulöse Gebilde bezeichnen wollen.

2) Die genannten Gebilde stellen wahrscheinlich das Erzeugnis degenerativer Prozesse dar, und müssen als karyorrhaktische oder karyolytische Erscheinungen angesprochen werden.

3) Diese Gebilde sind jedoch beim Trachom besonders häufig, während sie nur ausnahmsweise bei anderen morbösen Formen nachweisbar sind; man kann also logischerweise behaupten, daß sie eine Folge der spezifischen Infektionen sind. Wir wollen unsere Sätze kurz begründen.

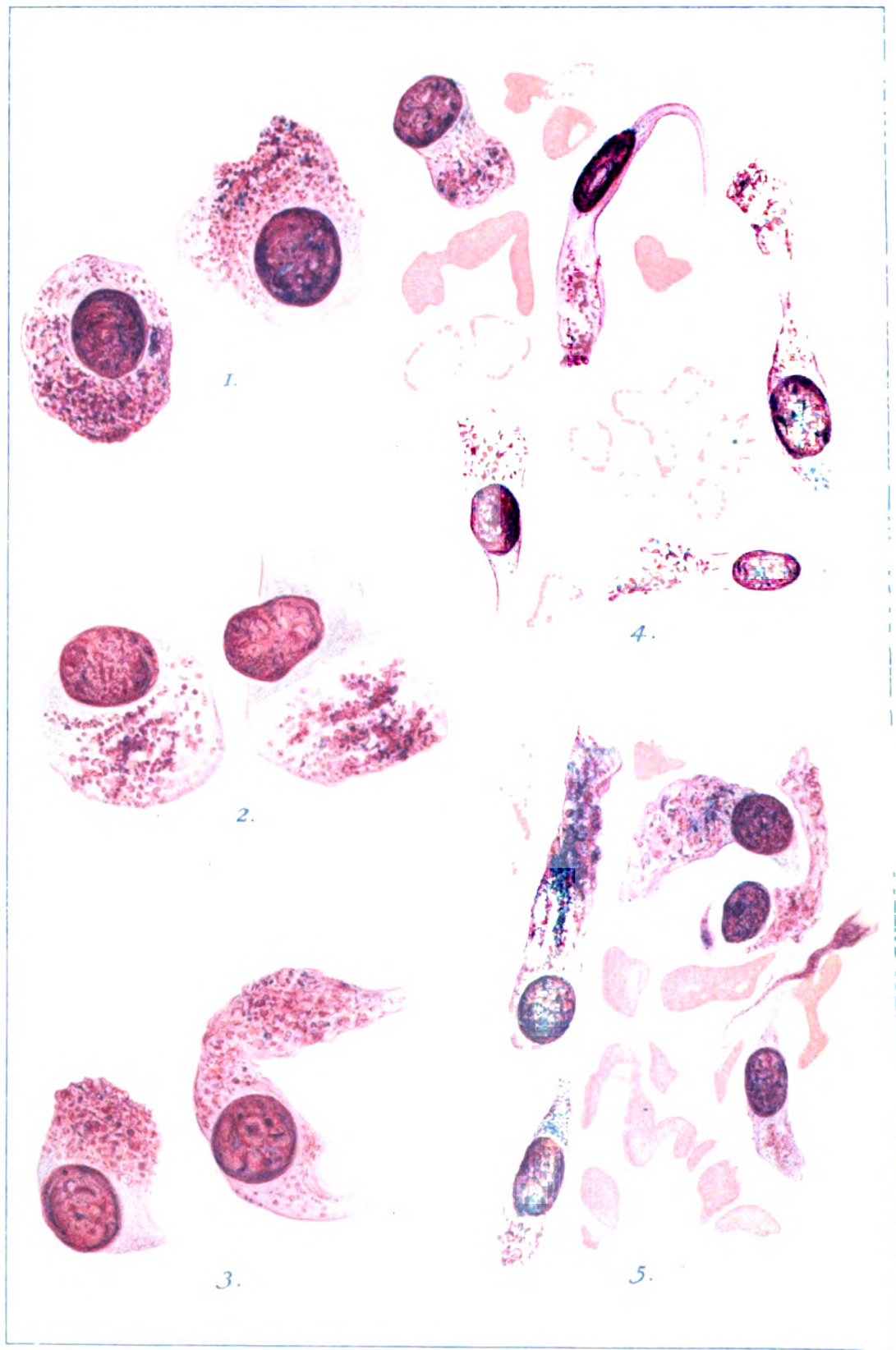
Daß diese aus nicht immer wohldefinierten Massen bestehenden, im Protoplasma, und zwar bald nahe beim Kern, bald entfernt von demselben liegenden, durch Giemsa's Flüssigkeit mehr oder weniger homogen violett gefärbten (stellenweise treten rote Punkte hervor) Gebilde nicht spezifisch sind, geht daraus hervor, daß wir ähnliche, wenn auch nicht identische Gebilde bei einem akuten Bindehautkatarrh und in mit gewöhnlichen Keimen infizierten Kaninchenbindehäuten beobachtet haben (Fig. 1—2—3).

Aus der Untersuchung der Abbildungen, in welchen die zu diesen Fällen gehörenden Präparate wiedergegeben sind, geht deutlich hervor, daß man nicht nur beim Trachom in den Zellen des Bindehautepithels rundliche oder sternförmige Massen beobachten kann, welche sich stellenweise vereinigen, so daß das Ganze eine mehr oder minder bestimmte und deutliche Form annimmt.

Diese Entartungsprodukte sind jedoch, wenn man vom Trachom absieht, äußerst selten nachweisbar; nur wenn man zahlreiche Präparate von sowohl klinisch wie ätiologisch verschiedenen Conjunctivitiden untersucht, kann man Gebilde der genannten Art finden.

Daß auch beim Trachom diese Gebilde Entartungsprodukte darstellen, scheint aus der von denselben angenommenen Färbung und daraus hervorzugehen, daß man zuweilen in deutlicher Karyorrhexis befindliche Kerne beobachtet. Diesbezüglich scheint uns übrigens der Fall sehr lehrreich, auf welchen sich die Präparate der Fig. 4—5 der dieser Arbeit beige-fügten Tafel beziehen.

Es handelte sich um ein 19-jähriges Mädchen, welches wegen eines beiderseitigen schweren Trachoms und einer chronischen, wieder akut verschlimmerten rechtsseitigen Dakryocystitis am 17. Nov. 1908 in der Augenklinik aufgenommen worden war. Nachdem die akuten Erscheinungen verschwunden waren, wurde der Tränensack entfernt, was in kleinen Stückchen geschehen mußte.



Bertarelli, Cecchetto.

Verlag von Gustav Fischer in Jena.

Platte mit 5 Abb.

Mit der inneren Oberfläche dieser Fragmente wurden Abstrichpräparate angefertigt und mit Giemsa's Flüssigkeit gefärbt.

Ueber diesen Fall wird Prof. Gallenga ausführlicher berichten. Uns interessiert vom morphologischen Standpunkte aus nur folgendes: Die Epithelzellen waren von mehr oder weniger groben, körnigen Massen invadiert, welche dieselben Farbstoffreaktionen aufwiesen, wie die von Prowazek angeführten plastinischen Massen.

Wenn es sich nun hier nicht um eine degenerative Erscheinung, sondern um eine mit dem Entwicklungszyklus des Parasiten zusammenhängende Zellenläsion handelte, müßte man doch mit Wahrscheinlichkeit wenigstens an einigen Stellen Zellenläsionen finden, welche anderen Perioden des Entwicklungszyklus des Parasiten entsprechen. Dagegen waren alle Präparate und alle Abschnitte der einzelnen Präparate einander gleich; man beobachtete nämlich eine allgemeine starke Zellenentartung, von welcher alle Bekleidungszellen des Sackes befallen waren.

Bei Betrachtung dieser Präparate begreift man, daß manche Autoren ohne weiteres haben behaupten können, daß die von Prowazek beschriebenen Körper als degenerative Erscheinungen zu deuten sind.

Besonders bemerkenswert in diesem Falle ist die äußerst große Häufigkeit dieser Zellenläsion, woraus man leicht folgern kann, daß zwischen der spezifischen Infektion und der Läsion selbst eine Beziehung besteht.

In keinem der Präparate, welche sich auf diesen Fall beziehen, konnten wir auch nur ein einziges Mal die typischen Prowazek'schen Körper beobachten, welche als granulöse Bildungen bezeichnet werden.

Die Schlußfolgerung, welche sich aus diesen Beobachtungen ergibt, ist sehr einfach: Beim Trachom des Menschen beobachtet man oft cellulare Veränderungen des Bindehautepithels, welche nicht spezifisch sind, aber bei dieser infektiösen Krankheit eine besondere Häufigkeit aufweisen.

Die Abbildungen dieser Veränderungen bieten nicht ein solches Aussehen dar, daß man sie bis jetzt logisch mit den verschiedenen Momenten einer zyklischen Entwicklung des Parasiten in Zusammenhang bringen kann.

Außer diesen Läsionen beobachtet man jedoch, wenigstens bei dem menschlichen Trachom, granulöse Gebilde verschiedener Größe, welche mit keiner bekannten degenerativen Erscheinung verwechselt und als parasitäre Gebilde wenigstens vermutet werden können. Diese endocellularen Gebilde sind jedoch selten.

Wenn auch diese Schlußfolgerungen nicht die Diskussion über die Aetiologie des Trachoms kupieren können, so scheinen sie uns jedoch das genau darzustellen, was man heutzutage aus einer sorgfältigen Betrachtung der Erscheinungen, welche sich beim menschlichen Trachom nachweisen lassen, ableiten kann.

Tafelerklärung.

Fig. 1—2. Epithelzellen der Bindehaut von nicht trachomatösen Con-junctivitis-kaninchen.

Fig. 3. Epithelzellen der menschlichen Bindehaut (katarrhalische akute Con-junctivitis).

Fig. 4—5. Bekleidungszellen des Tränensackes bei einem trachomatösen Menschen.

Färbung nach Giemsa. Zeiss Apochr. 2 mm 1,30. Komp.-Ok. 8. Länge der Röhre 160 mm.

Fig. 1—2 sind in der Zeichnung etwas vergrößert im Vergleich zu reellen Dimen-sion des mikroskopischen Bildes.

Nachdruck verboten.

Protéolase et antiprotéolase dans les cultures microbiennes.

[Travail du Laboratoire d'Hygiène et de Bactériologie de l'Université de Gand.]

Par le docteur **Henri De Waele** (Gand).

Les propriétés protéolytiques développées par les microbes constituent, du moins pour certains d'entr'eux, une des constatations les plus anciennes de la bactériologie: ce sont elles qui produisent la liquéfaction de la gélatine, à laquelle il fut porté jadis tant d'intérêt dans un but de classification et d'identification morphologiques.

Il ressort d'expériences de De Waele et Van de Velde¹⁾ que cette propriété de dissoudre la gélatine n'est pas qualitative, mais bien quantitative. En effet, quand on dose les albumoses et peptones à l'aide de la méthode proposée par ces auteurs, on voit que les microbes, qu'on considère comme liquéfiant, peptonisent rapidement la gélatine, et que ceux qui passent pour ne pas liquéfier la gélatine le font cependant, mais plus lentement. L'un et l'autre groupe microbien attaquent d'autres albumines telles la caséine d'une façon analogue et avec une vitesse proportionnelle à la vitesse avec laquelle est attaquée la gélatine. De telle façon que ces auteurs sont arrivés à la conclusion que les ferments protéolytiques, plus ou moins bien développés par les diverses bactéries, paraissent donc exister chez toutes, appartenir à un seul et même type enzymatique et agir d'une façon parallèle sur les divers produits albuminoïdes.

Une autre manifestation de l'activité de ces ferments protéolytiques est présentée par l'autolyse. Il faut citer surtout ici les travaux d'Emmerich²⁾ et de ses collaborateurs, de Levi et Pferrsdorf et de Conradi³⁾.

Dans les travaux d'Emmerich il s'agit de l'autolyse d'un microbe fortement liquéfiant: le bacille pyocyanique; la pyocyanase des ces auteurs a des propriétés protéolysantes, c'est plutôt le ferment que ses produits auquel cet auteur s'attache; Levy et Pferrsdorf⁴⁾ cherchent à obtenir plutôt des extraits des corps microbiens à l'aide d'une autolyse de 4 à 5 semaines; Conradi ne soumet les microbes qu'à une autolyse de courte durée, p. ex. 48 heures. Ces derniers auteurs visent à obtenir des produits qui, sans avoir les propriétés protéolysantes de la pyocyanase, auraient ses propriétés immunisantes; ces produits sont cependant en général assez toxiques.

On sait par les recherches d'Emmerich et Löw que la pyocyanase, grâce à ses propriétés protéolysantes, peut dissoudre d'autres microbes, ce qui se conçoit facilement.

Nous avons voulu étudier d'une façon plus systématique l'action des ferments protéolysants sur les microbes, avec le but de rechercher com-

1) De Waele et Van de Velde, Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. XXXIX. 1905.

2) Emmerich et Löw, Zeitschr. f. Hygiene 1899 u. 1901. — Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. XXXI. 1902.

3) Conradi, Hofmeisters Beiträge. 1901.

4) Levy u. Pferrsdorf, Deutsche med. Wochenschr. 1902.

ment les microbes résistent aux ferments protéolytiques tant étrangers que ceux qu'ils développent eux-mêmes dans leur milieu de culture.

Afin de pouvoir nous servir d'un ferment peptonisant constant, facile à obtenir en quantité suffisante et d'activité toujours identique pour toute la durée de nos expériences, nous nous sommes adressé à la trypsine (Merck).

Celle-ci est extraite à 2 %, par de l'eau chloroformée et filtrée; de ce filtrat clair on emploie 0,25 par tube de culture. D'une façon générale nous nous sommes servi de cultures de 8 jours environ. Ces cultures sont tuées préalablement par l'addition pendant 1, 2 ou 3 jours de 3 % d'acétone chloroformique à 3 %, qui n'entrave pas l'action des ferments.

A 2 cc. de culture on ajoute 0,25 de solution filtrée de trypsine à 2 %. Les tubes sont mis à 37° et l'action dissolvante se produit en 3 à 12 heures.

Afin de mettre en évidence l'intervention éventuelle des ferments propres du microbe, on porte comparativement des quantités égales de culture à des températures différentes: 55°, 65°, 75°, 85°, 100° C, avant d'y ajouter la trypsine.

Or pour la plupart des microbes l'action dissolvante de la trypsine est le plus manifeste dans les cultures chauffées; l'optimum se trouve entre 75° et 100° C; c'est le cas pour tous les microbes dits non liquéfiant (de la gélatine); seuls les liquéfiant présentent à certains moments des propriétés inverses.

Nous reviendrons plus loin sur ces exceptions apparentes, et nous résumons d'abord une première série d'expériences dans le tableau suivant.

Culture de 8 jours (sauf indication contraire)	Dissolution par trypsine de 2 cc. de culture préalablement chauffée à		
	non chauffée	55°	100° C
<i>Micrococcus tetragenus</i>	0	0	+
<i>Bac. typhosus</i> 17	+	+	+++
<i>B. typhosus</i> S	+	+	+++
<i>B. paratyphosus</i>	+	+	+++
<i>B. coli</i>	+	+	+++
<i>B. enteritidis</i> Aertryke	+	+	+++
" Moorzele	+	+	+++
" Sirault	+	+	+++
<i>Streptococcus</i>	0	0	+
<i>Meningococcus</i>	0	0	+
<i>Staphylococcus</i>	0	0	+
" Ra.	0	+	++
" hémolytique	0	++	+++
<i>Vibrio Metchnikoff</i>	0	+	+++
<i>Cholera Nazik</i> 2 jours	0	++	+++
" " 1 mois	+	+	+++
" Pf. 1 mois	++	++	+++
<i>Vibrio Finkler</i> 8 jours	+++	++	++
<i>B. pyocyaneus</i> 10 "	++	++	+
<i>B. "</i> 17 "	+	+	+++
<i>B. proteus</i> 10 "	+++	++	++
<i>B. prodigiosus</i> 10 "	+++	++	+
<i>B. megatherium</i> 10 "	0	+	+++
<i>B. fluorescens liquefaciens</i>	+++	++	++
<i>B. anthracis</i>	+++	++	+

0 signifie pas dissout.

+ signifie dissout légèrement.

++ signifie dissout notablement.

+++ totalement dissout (devient liquide clair).

Envisageons d'abord dans ce tableau les microbes non liquéfiant: il ressort immédiatement de cette expérience une première conclusion: après chauffage ils se laissent dissoudre beaucoup plus facilement.

Il paraît donc y avoir dans ces cultures une antiprotéolase relativement thermolabile.

Quand on se sert de cultures tuées au tricrésol, on observe (pour le *Bac. typhosus* du moins) le même phénomène, bien que la dissolution soit plus lente; l'antiprotéolase n'est donc pas détruite par le tricrésol.

Si maintenant on centrifuge une culture de *Bac. typhosus* et que l'on reprend les corps microbiens dans un volume de bouillon égal au volume primitif, puisque l'on fait agir la trypsine comparativement sur la culture primitive et sur la suspension de corps microbiens; on obtient les résultats suivants:

Cult. <i>Bac. typh.</i>	8 jours	+ trypsine	0
" " " chauffée à 100°		+ "	+++
Suspension de corps micr.		+ "	0
" " " chauffée à 100°		+ "	+

Il est facile de voir que l'action antiprotéolytique est plus active dans la suspension de corps microbiens; elle réside donc en majeure partie dans les corps microbiens et elle est partiellement contrebalancée par la partie liquide de la culture; il faudra plus loin insister davantage sur la démonstration que cette partie liquide a une certaine activité protéolysante.

L'âge de la culture, pour ces microbes non liquéfiant n'a qu'une importance minime, comme le montre l'expérience suivante:

	Cult. de 1 jour		8 jours		13 jours	
<i>Bac. typhosus</i>	37°	100°	37°	100°	37°	100°
trypsine	+	+++	+	+++	++	+++

Malgré l'augmentation de la masse des corps microbiens, principal siège de l'antiprotéolase, l'action antiprotéolytique est plus contrebalancée dans les cultures un peu âgées; c'est à dire qui se trouvent au moment où d'après le travail de De Waele et Van de Velde l'action protéolysante s'accuse davantage.

Ce que l'on observe pour les microbes liquéfiant (la gélatine) paraît au premier abord différent et plus compliqué.

En procédant comparativement avec des cultures d'âge différent on obtient le tableau suivant.

	1—2 jours			8—10 jours			17 jours			2 mois.		
<i>B. megatherium</i>	+	++	+++							++	++	+++
<i>B. proteus</i>	+	++	+++							++	++	+++
<i>B. prodigiosus</i>	+	+	+++							++	++	+
<i>B. anthracis</i>	++	++	+++	+++	++	+				+	++	+++
<i>B. pyocyaneus</i>	+	+	+++	++	++	+	+	+	+++			

Il en ressort que les cultures entières (et des expériences récentes nous ont montré que les cultures en gélatine sont souvent favorables sous ce rapport) à un moment variable, manifestent une activité protéolysante qui dépasse notablement l'action antiprotéolytique résidant dans les corps microbiens. Ce moment favorable, comme on le voit d'ailleurs dans le travail de De Waele et Van de Velde, cité plus haut, diffère d'après les espèces microbiennes. Avant et après ce moment les cultures se comportent suivant la règle générale.

Une autre expérience confirme également l'intervention du ferment protéolytique dans la façon dont les cultures répondent à l'action de la

trypsine: on sait par un travail de Malfitano et Lazarus¹⁾ que l'activité protéolytique du *Bac. anthracis* est plus forte à mesure que l'on diminue la concentration en peptone dans le milieu de culture. Le tableau suivant montre que plus la concentration en peptone est faible, c. à d. plus l'activité protéolytique est forte plus aussi l'action de la trypsine est renforcée; il faut cependant remarquer que cette expérience est entachée de l'erreur qui consiste en ce que la masse microbienne est également moindre quand la concentration en peptone est diminuée.

B. Anthracis Culture de 4 jours						
Concentration en Peptone		5 ‰	2 ‰	1 ‰	0,5 ‰	0,25 ‰
Cultures chauffées à 37°		++	++	+++	+++	+++
" " à 50°		+	+	++	++	+++
" " à 100°		+	+	+	++	+++

De même que pour le *bac. typhique*, il est facile de démontrer pour le *bac. du charbon* que l'action antiprotéolytique réside surtout dans les corps microbiens.

Culture non chauffée + trypsine	+++
" chauffée 100° + "	+
Mélange à parties égales de culture non chauffée et de culture chauffée à 100° + trypsine	++
Suspension de corps microbiens + trypsine	+
" " " " chauffée à 100° C + trypsine	+

Ici donc l'action protéolytique contrebalance l'action antiprotéolytique, puisqu'elle permet à la trypsine d'agir au maximum en favorisant son action; le chauffage à 100° a atténué bien plus notablement la protéolase que l'antiprotéolase.

L'existence de protéolase, présente spécialement dans la partie liquide de la culture, ainsi que d'antiprotéolase siégeant surtout dans les corps microbiens, en proportion et en équilibre différents d'après les cultures et l'âge des cultures pourrait se démontrer encore par le dosage de la peptonisation de substances albuminoïdes. Cette méthode se montre peu réalisable pour être appliquée à des séries d'expériences à faire à peu près en même temps.

Plus pratique, mais moins précis, nous a semblé l'emploi de tubes le *Mett*.

Le blanc d'œuf se prête mal à ces expériences, le sérum de cheval est plus favorable, mais malgré le chloroforme il est difficile d'assurer la stérilité pendant 2 à 3 jours à 37° C. C'est encore la gélatine qui donne, malgré le peu d'activité de la trypsine à la température 20° C, les résultats les plus satisfaisants. Ces essais montrent en tout cas que les actions protéolytiques et antiprotéolytiques s'exercent aussi vis-à-vis les substances étrangères à la culture.

Essais de peptonisation avec des tubes de <i>Mett</i> .						
Cultures chauffées préalablement à	37°	100°	Tubes de gélatine		sér. chev.	
			37°	100°	37°	100°
<i>B. typhosus</i> 4 jours	+	+++	11,5	10	4	3
<i>B. coli</i> " 24 h.	0	+++	12,5	9,5	3	2
<i>B. enteritidis</i>	+	+++	8	10	5	3,5
<i>Streptocoque</i>	0	+	12	8,5		
<i>Staphylocoque</i>	0	+++	8	12,5	6,5	7
<i>V. cholera</i> 3 jours	0	+++	12	13	10	6
<i>V. coli</i> " 1 mois	+	+++	12,5	19,5	8	11
<i>B. megatherium</i>	0	+++	8,5	11,5	6	6
<i>B. subtilis</i>			15,5	19		
Contrôle			14			

1) C. R. Soc. Biol. Paris 1907.

Essais comparatifs de la culture, du filtrat, et de la suspension de corps microbiens.

		B. megath.	B. megath.	B. proteus	B. enteritidis
Filtrat	37°	17	11,5	5,5	5,5
	50°	19		11	5,5
	100°	19,5	13,5	14	5
Culture	37°	17	13,5	6	4
	50°	19		6,5	5
	100°	17	13,5	12	6
Corps micr.	37°	4,5	6,5	6	
	50°	5		6,5	
	100°	5	7,5	7	
Tubes de gélatine de contrôle		14	13,5	14	10

Ces méthodes donnent des résultats trop peu précis pour nous fournir des données nouvelles. Nous n'y attachons donc qu'un intérêt relatif, celui de confirmer les autres parties du travail.

Si l'on fait agir la trypsine sur des cultures vivantes on observe dans les premières heures une dissolution inappréciable (typhus) ou partielle (charbon) des microbes; le plus grand nombre résiste et la culture reprend.

Résumé.

A côté de l'activité protéolytique développée dans les cultures microbiennes et ayant son siège spécialement dans la partie liquide de la culture, il existe une action antiprotéolysante renfermée surtout dans les corps microbiens; elle est thermolabile au dessus de 65°, donc un peu plus thermostable que la protéolase.

L'antiprotéolase compense généralement la protéolase, seule dans les cultures de microbes liquéfiantes (de la gélatine) la protéolase l'emporte au moment, variable d'ailleurs d'après les espèces microbiennes, où l'activité peptonisante est à son maximum.

Nachdruck verboten.

Ueber die verschiedene Wirkung der Pyocyanase auf Mikroben in festen und flüssigen Nährböden, sowie auf Virus und Vaccine des *Vibrio cholerae asiaticae*.

[Aus dem Kaiserl. Institute f. experimentelle Medizin in St. Petersburg.

Von Prof. W. Podwyssozki, unter Teilnahme von Dr. A. Adamoff.

Obwohl seit der bekannten Arbeit von Emmerich und Löw über die Bildung einer starken bakteriolytischen und bakteriziden Substanz in alten *Pyocyanus*-Kulturen, der Pyocyanase, schon viele Jahre verflossen sind und die Literatur über die Pyocyanase in der letzten Zeit sich stark vergrößert hat, bleibt doch das Wesen der zerstörenden Wirkung dieser enzymähnlichen Substanz auf die Bakterien bis jetzt unauferklärt. Es werden sogar von manchen Autoren (Klimoff, Raubitschek und Russ u. a.) gegen die Enzymnatur der Pyocyanase Einwände vorgebracht und ihre keimabtötende Eigenschaft auf die Gegenwart von Bakterienlipoiden zurückgeführt, eine Behauptung, welche neuerlich von Emmerich und Löw (Wien. klin. Wochenschr. 1898. No. 36) energisch bestritten wird.

Im nachfolgenden will ich kurz die Ergebnisse meiner unter Teilnahme von Dr. A. Adamoff unternommenen Untersuchungen über die Wirkungsweise der Pyocyanase (bezogen von Lingner-Dresden) auf *Bacillus diphtheriae*, *B. coli communis* und *Vibrio cholerae asiaticae*, sowie über die Bedingungen der therapeutischen Anwendung dieses Präparats berichten:

1. Von den drei näher untersuchten Mikroben, *Bac. diphtheriae*, *Vibrio cholerae asiaticae* und *Bac. coli communis* wirkt die Pyocyanase am schnellsten und auch am stärksten zerstörend auf den *Bac. diphtheriae*, etwas schwächer und langsamer auf den *Vibrio cholerae asiaticae* und am schwächsten auf den *Bac. coli communis*, welcher sehr lange der proteolytischen Wirkung der Pyocyanase widersteht. Während eine gewisse Menge von Diphtheriebacillen in einer Bouillonnährlösung mit Zusatz von unverdünnter Lingnerscher Pyocyanaselösung im Verhältnis von 2:1 (bei 37° C) schon nach 2 Stunden ganz zerstört resp. gelöst ist, wird dieselbe Menge von *Vibrio cholerae asiaticae* unter denselben Verhältnissen erst später, ca. nach 3—4 Stunden, zerstört. In den Nährlösungen, welche *Bacillus coli communis* enthalten, bleiben viele lebende Mikroben noch nach 72 Stunden erhalten, und sogar nach 10 bis 12 Tagen gelingt es noch, aus den Probiergläschen von der Mischung einer Lingnerschen Pyocyanaselösung mit einer Bouillonkultur von *Bac. coli communis* Mikroben zu züchten.

2. Bakterien auf festen Nährböden gezüchtet, widerstehen viel länger dem proteolytischen Einflusse der Pyocyanase als Bakterien in flüssigen Nährböden. Auf festen Nährböden wird nur die obere Schicht der Kultur angegriffen. So werden z. B. in einer Mischung von Pyocyanaselösung mit einer 36-stündigen Bouillonkultur von *Vibrio cholerae asiaticae* im Verhältnis von 1:2 (bei 37° C) alle Vibrionen nach 3 Stunden plasmolysiert oder in Fäden und schleimige Massen verwandelt und getötet. Ganz anders steht die Sache mit einer 36-stündigen Agarkultur, welche mit derselben Pyocyanaselösung reich begossen wird. Hier werden nur die oberflächlichen Schichten der Bakterienkolonien abgetötet und aufgelöst, während in den tieferen Schichten die Vibrionen lebendig und vollkommen lebensfähig bleiben, und zwar noch nach 3—4 Tagen, obwohl jeden Tag die Kultur mit frischer Pyocyanaselösung begossen und die Probiergläschen mit der Kultur fortwährend in horizontaler Lage gehalten wurden, damit sie beständig mit der Pyocyanaselösung bedeckt blieben. Offenbar diffundiert die bakterizide und proteolytische Substanz der Pyocyanase sehr schlecht in festen Nährböden, so daß man nicht auf eine Tiefenwirkung der Pyocyanase rechnen darf. Ich erinnere hier an die Beobachtungen von Fellner (Wiener klin. Wochenschr. 1908. p. 340), welcher bei der Behandlung der weiblichen Gonorrhöe mittels Pyocyanase derselben eine Tiefenwirkung abspricht. Das Gegenteil sehen wir bei der pigmenthaltigen Substanz der *Pyocyanus*-Kulturen, welche bekanntlich sehr gut die festen Nährböden durchtränkt.

3. Von der Anwendung der Pyocyanase als bakterizides und bakteriolytisches Mittel bei Behandlung von diphtheritischen und anderen bakteriellen Erkrankungen der zugänglichen Schleimhäute ist nur dann ein günstiger Erfolg zu erwarten, wenn die betreffenden pathogenen Mikroben zerstreut im flüssigen Sekret sich befinden, nicht aber in Form dichter Membranen

auf der Schleimhaut festsitzen. In einigen Fällen von postdiphtherischen, apyretisch verlaufenden Zuständen mit hartnäckiger und viele Tage (in einem Falle 23 Tage) dauernder Anwesenheit von Löfflerschen Bacillen im Nasen- und Rachenraume habe ich, wenn das antidiphtheritische Serum ohne Einfluß blieb, nur durch Anwendung von wiederholten Pyocyanasebestäubungen in einem Tage promptes Verschwinden der Diphtheriebacillen erzielt. Obwohl es also bei der Behandlung von ausgesprochener Diphtherie mit dichten Membranen zwecklos und sogar gefährlich ist, auf das Diphtherieheilserum zu verzichten und sich nur auf Bestäubungen mit Pyocyanase zu beschränken, wird es ganz berechtigt sein, bei postdiphtheritischen Zuständen zur definitiven Befreiung des Nasen- und Rachenraumes von Löfflerschen Bacillen die Behandlung mit Pyocyanase anzuwenden. Wiederholte Pyocyanase-Bestäubungen reichen bei hartnäckigen Bacillenträgern allein und besser als irgendwelche andere Mittel zum Freimachen der Schleimhäute von einzelnen im Schleim zerstreuten Diphtheriebacillen hin.

4) Die proteolytische Wirkung der Pyocyanase auf die lebendigen Erreger der Cholera asiatica und auf abgetötete Vibrionen (Kollesche Vaccine) ist sehr verschieden. Während lebende Vibrionen in einer Bouillonkultur sich schnell (in 2—3 Stunden) unter dem Einflusse der Pyocyanase lösen und im Laufe von 2—3 Stunden vollkommen zerstört werden, widerstehen die Vibrionen der Kolleschen Vaccine resp. die bei 65° C abgetöteten Vibrionen sehr lange der proteolytischen Wirkung der Pyocyanase und lösen sich außerordentlich langsam. Nach 3—4 Tagen bleibt noch die Mehrzahl der Vibrionen sichtbar und erst nach 8—10 Tagen des Verbleibens der Vaccine im Thermostat bei 37° C gemischt $\alpha\alpha$ mit der Pyocyanaselösung gelingt es endlich, alle Mikrobekörper zur Lösung zu bringen. Dieselben Verhältnisse der Pyocyanase einerseits zu den lebenden, andererseits zu den durch hohe Temperatur abgetöteten Mikroben treten auch beim *Bacillus diphtheriae* auf. Die durch Erhitzung bis auf 65° C abgetöteten Löfflerschen Bacillen widerstehen viel länger der lösenden Wirkung der Pyocyanase, als die entsprechenden lebenden Bacillen. Diese paradoxale Erscheinung erklärt sich hauptsächlich dadurch, daß die durch die Erwärmung geänderte resp. geronnene Eiweißsubstanz (Mykoprotein) der Mikrobekörper nicht so leicht durch die proteolytisch wirkende Pyocyanase angegriffen wird, wie die lebende Eiweißsubstanz.

Was in vitro stattfindet, muß auch teilweise in vivo geschehen. Das vielmals konstatierte Fehlen einer starken Reaktion gegenüber der Einspritzung der Kolleschen Choleravaccine, sowie die allmähliche Anhäufung von Antikörpern unter dem Einflusse der in den Kreislauf eingeführten Choleravaccine erklärt sich durch eine langsame und allmähliche Lösung der Mikrobekörper der Vaccine; die proteolytische Substanz der tierischen Gewebsflüssigkeiten wirkt offenbar auf die Bacillenkörper der Vaccine ähnlich ein, wie die proteolytische Substanz der Pyocyanase.

Nachdruck verboten.

Studien über das Verhalten des Rinderserums gegenüber den Mikroben.

Versuch einer neuen serodiagnostischen Methode.

[Aus dem Pasteur-Institute zu Brüssel (Direktor: Dr. J. Bordet).]

Von Dr. Osv. Streng, Helsingfors.

Die von mehreren Forschern, Ehrlich und Sachs¹⁾, Manwaring²⁾, Bordet und Gay³⁾, Muir et Browning⁴⁾ beobachtete die Hämolyse und Hämagglutination verstärkende Eigenschaft der inaktiven Rinder- und Ziegenserum hat zu verschiedenen Theorien und Erklärungen Anlaß gegeben. Ohne auf diese verschiedenen Hypothesen hier näher einzugehen, mag nur an die von Bordet und Gay aufgestellte Theorie erinnert werden, nach welcher die die Hämolyse und Hämagglutination verstärkende Eigenschaft des Rinderserums darauf beruht, daß dieses Serum einen eigentümlichen Stoff, „Colloïde de bœuf“, enthält, welcher sensibilisierte und alexinierte Blutkörperchen (Meerschweinchen- und Rinderblutkörperchen) sehr stark ausflockt und hämolysiert, dieselben Blutkörperchen aber weder in nativem Zustande, noch bei Gegenwart von Sensibilisatoren allein in sichtbarem Grade beeinflußt.

Bordet und Streng⁵⁾ haben die Theorie von Bordet und Gay aufs neue untersucht und weitergeführt. Dabei haben sie gezeigt, daß die von Sachs und Bauer⁶⁾ gegen diese Theorie (Bordet-Gay) gemachten Bemerkungen unzutreffend sind. Sie haben besonders den Unterschied zwischen gewöhnlicher Hämagglutination und dieser speziellen Zusammenballung der Blutkörperchen hervorgehoben.

Ich selbst habe früher⁷⁾ die Eigenschaft des Rinderserums, sensibilisierte und alexinierte Blutkörperchen zu hämolysieren und auszuflocken, benutzt, um die Existenz echter, Alexine neutralisierender Antialexine zu beweisen, wobei ich nicht nur Rinder- und Meerschweinchen-, sondern auch Pferde- und Ziegenblutkörperchen verwendete.

Da es mir aber theoretisch möglich erschien, daß diese von den verschiedenen obengenannten Forschern beobachtete, die Hämolyse und Hämagglutination verstärkende Eigenschaft des Rinderserums auch bei den Mikroben analoge Erscheinungen bewirken könnte, sobald die Mikroben sensibilisiert und alexiniert worden wären, habe ich die unten folgenden Untersuchungen anstellt, um zu sehen, ob und unter welchen Bedingungen die Mikroben von Rinderserum ausgeflockt werden.

Es ist ja leicht in vitro zu sehen, wann die Blutkörperchen sensibilisiert und alexiniert worden sind, sie werden ja dann hämolysiert, aufgelöst.

1) Ehrlich und Sachs, Berl. klin. Wochenschr. 1902.

2) Manwaring, Centralbl. f. Bakt. etc. Abt. I. Orig. Bd. XLI u. XLV. 1906 u. 1907.

3) Bordet und Gay, Ann. de l'Inst. Pasteur. 1906.

4) Muir et Browning, Proceedings of the Royal Society. 1904.

5) Bordet und Streng, Centralbl. f. Bakt. etc. Abt. I. Orig. Bd. XLIX. 1909.

6) Sachs und Bauer, Arbeiten aus dem Königl. Inst. f. exper. Therapie. Frankfurt a. M. 1907.

7) Streng, Osv., Zeitschr. f. Immunitätsforschung. Bd. I. 1908.

Auch die Mikroben nehmen, wie bekannt, das Alexin unter der Bedingung auf, daß sie erst mit einem entsprechenden Sensibilisatoren enthaltenden Serum behandelt, sensibilisiert worden sind. Es gibt, wie bekannt, Mikroben, welche dabei relativ schnell aufgelöst werden, z. B. *Vibrio cholerae*, aber es existieren auch andere, welche dabei nicht sichtbar in vitro aufgelöst werden.

Die Alexinaufnahme kann deshalb oft in vitro nicht direkt makroskopisch gesehen werden. Die auf diese Weise entstehende Bakteriolyse, Auflösung der Bakterien, ist oft zu schwach. Indirekt, durch die Komplementablenkungsmethode von Bordet und Gengou¹⁾, ist es möglich gewesen, in vitro die Alexinaufnahme der Mikroben nachzuweisen.

Wenn man aber zeigen könnte, daß ein seines Agglutinins beraubtes Rinder Serum nur solche Mikroben, welche mit entsprechenden Sensibilisatoren und mit Alexin vorbehandelt worden sind, ausflockt, ganz wie die Blutkörperchen, so würde man im Rinder Serum ein Reagens haben, mit Hilfe dessen man mit bekannten Mikroben die Diagnose eines unbekannten Immunserums direkt in vitro makroskopisch stellen könnte, und womit andererseits mit bekanntem Serum unbekannte Mikroben identifiziert werden könnten.

Es würde diese Eigenschaft des Rinder Serums das Studium der normalen und Immunsensibilisatoren ebenfalls erleichtern.

Wie wirkt das Rinder Serum auf die Mikroben?

Um eine Antwort auf die gestellte Frage zu erhalten, untersuchte ich erst, wie das Ochsen Serum allein, sowohl im frischen wie im inaktiven Zustande — also mit und ohne Alexin — auf verschiedene Mikroben einwirkt.

Ich habe meine Versuche mit *Bac. typhi*, *coli*, *diphtheriae*, *cholerae*, *pseudodiphtheriae*, *tuberculosis*, *pertussis*, *Staphylococcus aureus* und *Streptococcus pyogenes* angestellt. Zuerst aber will ich kurz erwähnen, was frühere Forscher über die „Agglutination“ dieser Mikroben gefunden haben. Das Agglutinationsvermögen des Rinder Serums ist von einer großen Anzahl verschiedener Forscher studiert worden.

Die Agglutination des *Bac. typhi* durch normales Rinder Serum ist von Hahn und Trommsdorff²⁾, Lüdke³⁾, Müller⁴⁾, Grabert⁵⁾, Löwit⁶⁾, Besredka⁷⁾, Rissling⁸⁾ u. a. untersucht worden. Alle diese Forscher geben an, daß das Rinder Serum die Typhusbacillen agglutiniert, und zwar in ziemlich starkem Grade. Lüdke hat sogar noch im Verhältnis von 1:100 Agglutination gefunden. Die von Müller angegebene und von Lüdke bestätigte Tatsache, daß Kälberserum gar nicht oder nur sehr schwach — 1:1 — die Typhusbacillen agglutiniert,

1) Bordet und Gengou, Annal. de l'Inst. Pasteur. 1906.

2) Hahn u. Trommsdorff, Münch. med. Wochenschr. 1900.

3) Lüdke, Deutsch. Arch. f. klin. Med. 1904. Centralbl. f. Bakt. etc. Abt. I. Orig. Bd. XXXVII. 1904.

4) Müller, Dissert. Bern 1901, ref. von Rissling, Centralbl. f. Bakt. etc. Abt. I. Ref. Bd. XLIV.

5) Grabert, Dissert. Gießen 1904, ref. von Rissling, Centralbl. f. Bakt. etc. Abt. I. Ref. Bd. XLIV.

6) Löwit, Centralbl. f. Bakt. etc. Abt. I. Orig. Bd. XXXIV. 1904.

7) Besredka, Ann. de l'Inst. Pasteur. 1901.

8) Rissling, Centralbl. f. Bakt. etc. Abt. I. Orig. Bd. XLIV. 1907.

während Sera von erwachsenen Tieren einen erheblich höheren Agglutinationstiter zeigen, will ich hier besonders hervorheben, da ich noch auf diese sehr interessante Tatsache zurückkommen will. Dieser Befund, daß sich in dem Serum während des späteren Lebens des Tieres Agglutinine selbständig bilden können, hat nämlich durch meine Versuche gewissermaßen eine Erklärung gefunden.

Noch ist folgende von Rissling beobachtete Tatsache besonders zu erwähnen: Rissling hat nämlich nachgewiesen, daß frisches Rinderserum, welches die Typhusbacillen 1:40 agglutiniert, auch alle anderen von ihm untersuchten Mikroben, nämlich *Vibrio cholerae asiaticus*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *B. anthracis*, *Proteus vulgaris*, *B. coli*, *B. suipestifer*, *B. avisepticus*, *B. suis*, *B. mallei* und *Rotlaufbacillus* agglutiniert.

Ueber *B. coli* existieren auch zahlreiche Untersuchungen von Grabert¹⁾, Löwit²⁾, Lüdke³⁾, Müller⁴⁾, Rissling⁵⁾ u. a. Alle geben an, daß *B. coli* von Rinderserum agglutiniert wird. Müller⁶⁾ macht auch betreffs des *B. coli* darauf aufmerksam, daß Serum von erwachsenen Ochsen den Bacillus ziemlich stark agglutiniert, während Serum von Kälbern gar keine oder nur eine geringe Agglutination hervorruft. In diesem Zusammenhange mögen noch die Untersuchungen von Grünbaum⁷⁾, Pfaundler⁸⁾, Kraus u. Löw⁹⁾ u. a. erwähnt werden, welche bei Sera von Menschengenossen und Meerschweinchenföten keine Agglutination von Coli-Bacillen, wohl aber bei den Sera von Erwachsenen gefunden haben.

Ueber die Agglutination der *B. diphtheriae*, *pseudodiphtheriae* und *pertussis* durch Rinderserum liegen meines Wissens keine genaueren Angaben vor.

Staphylo- und Streptokokken werden nach Angabe von Rissling⁵⁾ durch frisches Rinderserum 1:30 agglutiniert.

Hetsch u. Lentz¹⁰⁾, Lüdke³⁾, Löwit²⁾, Kolle u. Gotschlich¹¹⁾, Rissling geben an, daß *B. cholerae* durch Rinderserum agglutiniert wird.

Für die Tuberkelbacillen liegt eine große Anzahl von Beobachtungen vor. Wegen des großen Interesses, welches das Verhalten der Rindersera gegenüber diesen Bacillen hat, werde ich später auf die Angaben über die Agglutination der Tuberkelbacillen durch Rinderserum noch zurückkommen.

Ueber den Unterschied zwischen der Wirkung des frischen, das ist des alexinhaltigen, und des bei 56° C inaktivierten Rinderserums auf alle diese Bakterien liegen nur wenige Beobachtungen vor. Das die Tuberkelbacillen agglutinierende Vermögen des Rinderserums geht nach

1) Grabert, a. a. O.

2) Löwit, a. a. O.

3) Lüdke, a. a. O.

4) Müller, a. a. O.

5) Rissling, a. a. O.

6) Müller, a. a. O.

7) Grünbaum, ref. von Paltauf, Handb. der path. Mikroorganismen von Kolle-Wassermann.

8) Pfaundler, Jahrb. f. Kinderheilk. Bd. L.

9) Kraus u. Löw, K. k. Ges. d. Aerzte in Wien. 1899. Wiener klin. Wochenschr. ft. 1899.

10) Hetsch u. Lentz, Festschr. z. 60. Geburtstag von R. Koch. Jena 1903.

11) Kolle u. Gotschlich, Zeitschr. f. Hyg. 1903.

den Angaben von Romberg¹⁾, Thellung²⁾ u. a. durch Erhitzen auf 56° verloren. Wie sich in dieser Hinsicht die „Agglutinine“ des Rinderserums gegenüber den anderen von mir untersuchten Mikroben verhalten, habe ich nicht näher untersucht gefunden. Rissling hat immer das Rinderserum möglichst frisch untersucht, also mit Alexin (Komplement) enthaltendem Serum gearbeitet.

Zuerst machte ich einige Versuche, um den eventuellen Unterschied in der zusammenballenden Wirkung einerseits des alexinhaltigen frischen Rinderserums und andererseits des durch 1/2 Stunde dauerndes Erhitzen bei 56° C inaktivierten Serums auf die Mikroben festzustellen. Dabei habe ich nicht die untere Grenze ausgetriert, bei welcher die Zusammenballung der Mikroben in beiden Fällen noch entsteht, weil bei dem Verdünnen des alexinhaltigen Serums ja nicht nur die eventuellen Agglutinine, sondern auch das Alexin so verdünnt werden, daß es nicht mehr als Alexin wirken kann und man also nicht die eventuelle Bedeutung des Alexins für die Zusammenballung beurteilen kann. Ich habe deshalb hauptsächlich bei größeren Dosen, das ist bei Gegenwart genügender Mengen Alexins, die Stärke der durch frisches Serum entstehenden Reaktion, die Schnelligkeit, mit welcher sie entsteht, und die Größe der entstandenen Flocken mit der durch inaktives Serum hervorgerufenen Reaktion verglichen.

In meinen Versuchen verhielten sich die Tuberkelbacillen wie in den von Romberg¹⁾ und Thellung²⁾ gemachten. Das die Tuberkelbacillen „agglutinierende“ Vermögen der Rindersera war durch 1/2-stündiges Erhitzen auf 56° vollständig verschwunden, während das frische, alexinhaltige Serum eine starke Reaktion gab.

Eine genügend homogene Tuberkelbacillenemulsion habe ich mir so bereitet, daß ich Tuberkelbacillen von ca. 3 Wochen alten Glycerin-Kartoffelkulturen unter allmählichem Zufügen von physiologischer Kochsalzlösung mittels eines Glasstäbchens gründlich zerrieb. Diese Bakterienemulsion wurde, wie überhaupt alle anderen von mir benutzten Bakterienemulsionen, ungefähr so dick gemacht wie eine als Standard benutzte, nach 24-stündigem Wachstum mit Formalin 0,5:1000 versetzte abgetötete Typhusbouillonkultur. Von dieser Tuberkelbacillenemulsion wurden 0,5 ccm in jede von 2 Reagensgläsern gebracht. Das eine wurde mit 0,1 ccm frischen, das andere mit derselben Menge inaktiven Rinderserums versetzt. Von diesen Gläsern zeigt das mit frischem Rinderserum versetzte anfangs, die erste Viertelstunde, nichts, aber ziemlich plötzlich nach ca. 20 Minuten bei 37° C entsteht eine sehr starke und charakteristische Zusammenballung der Mikroben, langsamer, wenn die Reagensgläser ruhig stehen bleiben, schneller, wenn sie von Zeit zu Zeit schwach bewegt werden. Das andere Reagensgläsern aber zeigt keine Einwirkung des Serums, nicht einmal nach mehreren Stunden.

In ähnlicher Weise verhält sich das Rinderserum auch z. B. gegenüber einer mit physiologischer Kochsalzlösung gemachten Aufschwemmung von auf Serum durch 24 Stunden gezüchteten Diphtheriebacillen.

Aehnliche Aufschwemmungen von einer Typhusagarkultur und Typhusbouillonkultur wurden dagegen noch von dem bei 56° C inaktivierten Rinderserum zusammengeballt. Auch Colibacillen werden noch durch inaktives Rinderserum ausgeflockt.

1) Romberg, Münch. med. Wochenschr. 1902.

2) Thellung, Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. XXXII.

Das Typhus- und Colibacillen zusammenballende Vermögen des Rinderserums war also noch nach Inaktivierung bei 56° C erhalten, während dasselbe Serum unter diesen Bedingungen vollständig seine Wirkung auf die von mir benutzten Tuberkel- und Diphtheriebacillen verloren hatte.

Diese Tatsache, daß die Agglutinine des Rinderserums gegenüber den verschiedenen Mikroben sich verschieden verhielten, könnte ja einfach so erklärt werden, daß diese verschiedenen „Agglutinine“ eine verschiedene Resistenz gegen die Wärme hätten. Dies ist ja auch die Erklärung, welche man bis jetzt für diese und ähnliche Erscheinungen gegeben hat. Ich selbst habe früher¹⁾ eingehend die Einwirkung höherer Temperaturen auf verschiedene Immun- und Normalagglutinine untersucht. Bei den von mir damals untersuchten Agglutininen handelte es sich aber um wirkliche Agglutinine, i. e. um eine solche, die Mikroben zusammenballende Eigenschaft der verschiedenen Sera, welche noch erhalten blieb, nachdem das Alexin des Serums inaktiviert worden war. In dem jetzt zu besprechenden Falle liegen die Sachen aber ganz anders. Hier ist es von vornherein nicht ganz entschieden, daß die von dem frischen Rinderserum hervorgerufene Zusammenballung der 4 untersuchten Mikroben immer eine wirkliche Agglutination wäre. Für die Zusammenballung der Typhus- und Colibacillen scheint die Sache klar zu sein. Gegenüber diesen Mikroben scheint das Rinderserum wirkliche, obwohl schwache Agglutinine zu enthalten, da dieselben, nachdem das Serum auf 56° C erhitzt und so seines Alexingehaltes beraubt worden war, wenigstens teilweise zurückgeblieben sind.

Für das Verschwinden der Zusammenballung von Diphtherie- und Tuberkelbacillen kann man auch eine andere Erklärung als eine eventuelle größere Thermolabilität der Tuberkel- und Diphtherieagglutinine geben.

Man könnte sich ganz gut in Analogie mit der von Bordet und Gay²⁾, Bordet und Streng³⁾ für Blutkörperchen aufgestellten Erklärung die Sache so denken, daß das Rinderserum gegen diese 2 Mikroben normale Sensibilisatoren enthielte, welche die Mikroben sensibilisierten hätten, so daß sie das Alexin aus dem Rinderserum nehmen könnten und dann durch kolloide Stoffe des Rinderserums ausgeflockt worden wären. In diesem Falle wäre die Inaktivierung des Alexins, nicht die des Agglutinins die Ursache, warum die Zusammenballung dieser Mikroben bei auf 56° C erhitztem Rinderserum ausbleibt.

Welche Hypothese ist in diesem Falle die richtige? Ist das Ganze nur als eine hochgradige Thermolabilität der Tuberkel- und Diphtherieagglutinine zu betrachten, oder existiert bei diesen Mikroben eine Zusammenballung, welche dann viel komplizierter aufzufassen ist als die gewöhnliche Agglutination?

Wenn die Zusammenballung der Tuberkel- und Diphtheriebacillen durch frisches Rinderserum so zu erklären ist, daß die Mikroben durch das Rinderserum sensibilisiert werden, so daß sie Alexin aufnehmen können und erst dann durch den in dem Rinderserum befindlichen kolloiden Stoff ausgeflockt werden, so muß die Zusammenballung der Mikroben wieder eintreten, wenn man das inaktivierte Rinderalexin durch irgendwelches andere Alexin ersetzt. Wenn es sich aber hier nur um

1) Streng, Zeitschr. f. Hygiene. 1908.

2) Bordet und Gay, a. a. O.

3) Bordet und Streng, a. a. O.

thermolabile Agglutinine handelte, könnte ein nicht agglutinierendes alexinhaltiges Serum die Stärke des inaktiven, nicht agglutinierenden Rinderserums nicht wiederherstellen. In der Tat zeigt sich, daß man das inaktive, nicht agglutinierende Rinderserum durch Zufügen von einem allein nicht agglutinierenden, aber alexinhaltigen ganz frischen Serum von einem anderen Tiere wieder gegenüber Tuberkel- und Diphtheriebacillen wirksam machen kann.

Es wurden 8 Reagensgläschen z. B. in folgender Weise beschickt:

- 1) $\frac{1}{2}$ ccm in physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmte Diphtheriebacillen + 0,10 ccm inaktives Rinderserum.
- 2) $\frac{1}{2}$ ccm von derselben Diphtheriebacillenaufschwemmung + 0,10 ccm frisches Meerschweinchen Serum.
- 3) $\frac{1}{2}$ ccm von derselben Aufschwemmung + 0,10 ccm inaktives Rinderserum + 0,10 frisches Meerschweinchen Serum.
- 4) $\frac{1}{2}$ ccm von derselben Aufschwemmung + 0,10 ccm frisches Pferdeserum.
- 5) $\frac{1}{2}$ ccm von derselben Aufschwemmung + 0,10 ccm inaktives Rinderserum + 0,10 frisches Pferdeserum.
- 6) $\frac{1}{2}$ ccm von derselben Aufschwemmung + 0,10 ccm frisches Rinderserum.
- 7) $\frac{1}{2}$ ccm von derselben Aufschwemmung + 0,10 ccm frisches Kaninchenserum.
- 8) $\frac{1}{2}$ ccm von derselben Aufschwemmung + 0,10 ccm inaktives Rinderserum + 0,10 frisches Kaninchenserum.

Wenn diese Tuben in den Thermostaten bei 37° C 2 Stunden lang gestellt werden, so entsteht in den Tuben 1, 2, 4 und 7 keine Zusammenballung¹⁾. Dagegen tritt in den Tuben 3, 5, 6 und 8 schon in $\frac{1}{2}$ Stunde eine sehr charakteristische Erscheinung hervor. Besonders wenn die Tuben von Zeit zu Zeit etwas bewegt, aber auch wenn sie in ruhiger Lage gehalten werden, bekommt man in diesen Tuben eine sehr starke charakteristische Ausflockung der Bakterien, welche ein ganz anderes Aussehen hat als die gewöhnliche Agglutination. Das bei 56° C inaktiv gewordene Rinderserum, welches sein Alexin verloren hat und keine Agglutination zeigt, wird wieder durch eine entsprechende Menge nicht agglutinierenden, frischen, Alexin enthaltenden Serums von einer anderen Tierart aktiv gemacht. Mit Hilfe der gewöhnlichen Agglutinationstheorie ist diese Tatsache nicht zu verstehen. Die Sache wird aber leicht erklärt, wenn man an die andere aufgestellte Hypothese denkt. Nach dieser wäre die durch frisches Rinderserum hervorgerufene Zusammenballung der von mir benutzten Diphtheriebacillen nicht als eine gewöhnliche Agglutination zu betrachten, sondern als eine Zusammenballung, bei welcher eine Alexinwirkung nötig ist.

Bordet und Gay, Bordet und Streng haben gezeigt, daß die Meerschweinchenblutkörperchen durch frisches, diese Blutkörperchen gar nicht oder nur schwach agglutinierendes Pferdeserum + nicht agglutinierendes inaktives Rinderserum stark zusammengeballt werden, und weiter haben sie nachgewiesen, daß die Blutkörperchen in diesem Falle durch Pferde- und Rinderserum sensibilisiert, durch Pferdeserum alexiniert worden sind und die beobachtete starke Zusammenballung auf der Wirkung eines in dem Rinderserum befindlichen Stoffes, eines „Kolloides“, beruht, welcher Stoff nur nach vorhergehender Sensibilisierung und Alexinierung in Aktion treten kann. Wegen der theoretischen Auffassung dieses Phänomens verweise ich auf die Arbeit von Bordet und Streng²⁾.

1) Mit Pferdeserum allein tritt bisweilen eine leichte Zusammenballung auf.

2) Bordet und Streng, a. a. O.

Ich habe soeben gezeigt, daß die Zusammenballung der Diphtheriebacillen die Gegenwart des Alexins erfordert, ebenso wie die obengenannte spezielle Ausflockung der Blutkörperchen nur bei Gegenwart von Alexin zum Vorschein kommt. Wenn die Analogie zwischen den Diphtheriebacillen und den Meerschweinchenblutkörperchen eine vollständige ist, so übt das frische Rinderserum eine dreifache Wirkung auf diese Mikroben aus: Erstens werden die Mikroben durch die bei 56° C nicht inaktivierten Sensibilisatoren des Rinderserums sensibilisiert; zweitens gibt das Serum seine thermolabilen Alexine an die Mikroben ab, und drittens ruft das Serum durch seine thermostabilen, bei 56° C nicht zerstörten kolloiden Substanzen eine starke Ausflockung der auf diese Weise sensibilisierten und alexinierten Mikroben hervor. Wenn das Alexin durch Erhitzen auf 56° C ausgeschaltet wird, entsteht nichts; wenn man aber das inaktivierte Alexin durch neues Alexin von einem anderen Tiere ersetzt, so sind die Bedingungen zum Hervortreten des Phänomens da und eine Zusammenballung findet statt, aber eine solche kommt nicht zum Vorschein ohne das inaktive Rinderserum, welches kolloide Substanzen in großen Mengen enthält; ein nur Alexin und eventuelle Sensibilisatoren enthaltendes Serum hat allein keine sichtbare Wirkung.

Ganz wie die Diphtheriebacillen verhält sich die früher genannte Emulsion von auf Glyzerinkartoffeln gezüchteten Tuberkelbacillen sowohl vom Typus humanus wie vom Typus bovinus. Auch gegenüber diesen Mikroben konnte ein unwirksames inaktives Rinderserum durch Zusatz von neuem Alexin, gleichgültig von welchem Tiere es entnommen wurde, wieder aktiv gemacht werden.

Durch diese jetzt beobachtete Tatsache ist die Existenz eines der Agglutination ähnlichen Phänomens bei Mikroben, welches aber nicht als eine Agglutination aufzufassen ist, wahrscheinlich gemacht.

Wie könnte man aber beweisen, daß diese von mir jetzt erwähnte Erscheinung wirklich nichts mit dem gewöhnlichen Agglutinationsphänomen zu tun hat, sondern, wie ich eben auseinandergesetzt habe, als ein bedeutend komplizierterer Prozeß zu deuten ist? Um das zu beweisen, muß man folgendes zeigen können:

Das Phänomen muß immer entstehen, wenn alle diese drei Faktoren, Alexin, Sensibilisator, Kolloid, in genügender Menge da sind, muß aber immer vermißt werden, sobald nur einer von diesen Faktoren nicht vorhanden ist; es muß also ausbleiben 1) sobald nur das Alexin ausgeschaltet wird, 2) sobald nur die Sensibilisatoren nicht da sind, 3) sobald nur der kolloide Stoff des Rinderserums nicht vorhanden ist.

Noch muß man zeigen können, daß die gewöhnlichen Agglutinine des Rinderserums nichts zu tun haben mit dem hier wirksamen ausflockenden Stoffe dieses Serums, d. h. das Phänomen muß entstehen, auch wenn die gewöhnlichen Agglutinine des Rinderserums ausgeschaltet worden sind, wenn nur die sonstigen Bedingungen des Phänomens da sind.

Es muß gezeigt werden, daß diese Zusammenballung nicht als eine Verstärkung der Agglutination aufzufassen ist, so daß die Mikroben weder durch Sensibilisierung noch durch Alexinaufnahme gegen gewöhnliche Agglutinine empfindlicher werden. Man muß die im Rinderserum befindlichen eventuellen Agglutinine von den auf sensibilisierte und alexinierte Mikroben wirkenden Stoffen trennen können.

Alle diese Bedingungen zu erfüllen, ist mir, wie aus dem Folgenden hervorgehen wird, gelungen.

1) Ausschaltung des Alexins.

Die zu besprechende Zusammenballung der Mikroben muß immer ausbleiben, sobald nur das Alexin ausgeschaltet ist, muß aber sofort eintreten, wenn Alexin wieder zugefügt wird.

Ausschaltung durch Erhitzen. Oben habe ich gezeigt, daß, wenn frisches Rinderserum durch $\frac{1}{2}$ Stunde dauernde Erhitzung auf 56° C inaktiviert, i. e. seines Alexins beraubt worden ist, die von demselben hervorgerufene Zusammenballung der Diphtherie- und Tuberkelbacillen verschwindet, aber sofort wieder auftritt, wenn das inaktivierte Rinderalexin durch Pferde-, Meerschweinchen-, oder Kaninchenalexin ersetzt wird. Die Reaktion entsteht bei Verwendung der verschiedenen Alexine nicht mit gleicher Geschwindigkeit. Das Kaninchenalexin scheint am schwächsten zu wirken. Wenn dieses Alexin benutzt worden ist, so müssen die Tuben etwas geschüttelt oder in leiser Bewegung gehalten werden, um das Phänomen zu erhalten. Ueberhaupt muß bemerkt werden, daß diese eigentümliche, von der Gegenwart des Alexins abhängende Zusammenballung auch bei Verwendung anderer Alexine immer besser hervortritt, wenn man die Tuben von Zeit zu Zeit in schwacher Bewegung hält oder etwas schüttelt.

Ausschaltung durch Aqu. dest. Man kann das Alexin nicht nur durch Erhitzen aus dem Serum entfernen, sondern es gibt auch andere Methoden, um ein Verschwinden des Alexins herbeizuführen. Man kann z. B. durch Verdünnung des Rinderserums mit Aqu. dest., wobei das Serum durch ausgeflockte Eiweißsubstanzen trübe wird, das Serum seines Alexins berauben [Tsuda¹⁾]. Ueber die Wirkung des Salz mangels und der Dialyse wird ähnliches bei anderen Sera von mehreren anderen Forschern berichtet [Buchner²⁾, Brand³⁾, Ferrata⁴⁾, Bauer⁵⁾, Sachs u. Teruuchi⁶⁾ u. a.].

Ein mit Aqu. dest. behandeltes, nach genügender Zeit mit konzentrierter Kochsalzlösung wieder physiologisch gemachtes Rinderserum zeigt nur schwache oder keine hämolytischen Eigenschaften mehr gegen sensibilisierte Blutkörperchen; das Alexin ist vollständig verschwunden. Daß die Agglutinine dabei verschwinden sollten, hat meines Wissens niemand behauptet. Im Gegenteil ist von verschiedenen Seiten hervorgehoben worden, daß die Agglutinine nicht einmal durch Wochen dauernde Dialyse verschwinden.

Wie verhält sich jetzt ein mit Aqu. dest. vorbehandeltes und dadurch seines Alexins beraubtes frisches Rinderserum gegenüber den Mikroben?

Wir bringen zuerst 2 ccm frischen Rinderserums in jede von zwei Tuben I und II. In Tube I werden 9 ccm Aqu. dest., in Tube II 10 ccm physiologischer Kochsalzlösung (9:1000) zugefügt. In Tube I entsteht sofort eine starke Ausflockung, nach 1—2 Stunden wird nochmals zu

1) Tsuda, Berl. klin. Wochenschr. 1908.

2) Buchner, ref. von Tsuda.

3) Brand, Berl. klin. Wochenschr. 1907.

4) Ferrata, Berl. klin. Wochenschr. 1907.

5) Bauer, Arb. aus dem Königl. Institut f. exp. Therapie. Frankfurt a. M. 1907.

6) Sachs u. Teruuchi, Berl. klin. Wochenschr. 1907.

dieser Tube 1 ccm Kochsalzlösung 9:100 zugefügt. Dabei lösen sich die entstandenen Ausflockungen vollständig auf, so daß man jetzt in beiden Tuben gleich viel, 12 ccm, klare, ganz dieselben Mengen von Serum, Aqu. dest. und Kochsalzlösung enthaltende Flüssigkeiten hat. Der einzige Unterschied ist, daß in Tube I das Rinderserum nicht direkt wie in Tube II mit 10 ccm physiologischer Kochsalzlösung verdünnt worden ist, sondern zuerst mit 9 ccm Aqu. dest. und erst dann mit 1 ccm 9-proz. Kochsalzlösung, d. i. im ganzen mit 10 ccm physiologischer Kochsalzlösung versetzt wurde. Die Flüssigkeit I hat durch die Behandlung mit Aqu. dest. ihr Alexin verloren, in der Flüssigkeit II ist das Alexin zurückgeblieben. Die eventuell vorhandenen gewöhnlichen Agglutinine sind in beiden zurückgeblieben.

Machen wir jetzt mit diesen zwei Flüssigkeiten z. B. folgende Mischungen:

- a) $\frac{1}{2}$ ccm ähnlicher Diphtheriebacillenaufschwemmung wie früher + 1 ccm Flüssigkeit I.
- b) $\frac{1}{2}$ ccm von der Diphtheriebacillenaufschwemmung + 1 ccm Flüssigkeit II.
- c) $\frac{1}{2}$ ccm ähnlicher Tuberkelbacillenaufschwemmung Typus humanus wie früher - 1 ccm Flüssigkeit I.
- d) $\frac{1}{2}$ ccm von derselben Tuberkelbacillenaufschwemmung + 1 ccm Flüssigkeit II.
- e) 0,05 ccm Meerschweinchenblutkörperchen + 1 ccm Flüssigkeit I.
- f) 0,05 ccm Meerschweinchenblutkörperchen + 1 ccm Flüssigkeit II.

Nach einiger Zeit, schneller beim Schütteln, in ca. 10—15 Minuten, langsamer beim Stehen bei 37° C, in ca. 25—30 Min., entstand in den Tuben b und d eine starke Zusammenballung der Mikroben. In den Tuben a und c war keine Zusammenballung zu sehen, nicht einmal am folgenden Tage. Fügt man aber zu den Tuben a und b ein wenig (z. B. Meerschweinchen-)Alexin zu, so entsteht auch in diesen eine starke Zusammenballung, obwohl das Meerschweinchenalexin allein in zwei Kontrolltuben keine sichtbare Wirkung hatte.

Die Tube e kontrolliert, daß die Flüssigkeit I alexinfrei ist, die Blutkörperchen bleiben intakt. In der Tube f entsteht dagegen in $\frac{1}{2}$ Stunde eine vollständige Hämolyse; die Flüssigkeit II enthält Alexin.

Die Uebereinstimmung mit dem p. 52 angeführten Versuche ist vollständig, nur ist das Rinderalexin in dem jetzt angeführten Versuche durch Aqu. dest., in dem früheren Falle durch Erhitzung ausgeschaltet.

Man könnte vielleicht das Ausbleiben der Zusammenballung auf die Weise erklären wollen, daß die Agglutinine gegen Tuberkel- und Diphtheriebacillen so empfindlich gegenüber auch einer kurzen, 1—2 Stunden dauernden Einwirkung von Aqu. dest. sind, daß sie nicht mehr agglutinierend wirken können. Diese Erklärung steht aber vollständig im Widerspruch mit allem, was man über die Bedeutung der Dialyse für die Agglutinine kennt. Eine solche Erklärungsweise läßt noch, auch wenn man von ihrer Unwahrscheinlichkeit sonst absieht, die Tatsache unaufgeklärt, warum die Zusammenballung wieder entsteht, sobald ein neues Alexin der Mischung zugefügt wird.

Die Notwendigkeit der Gegenwart des Alexins wird durch diesen Versuch überzeugend gezeigt.

Ausschaltung durch sensibilisierte Blutkörperchen. Man kann noch die Bedeutung des Alexins auch dadurch beweisen, daß solches Rinderserum, aus welchem man mit Hilfe sensibilisierter Blutkörperchen das Alexin entfernt hat, seine, die jetzt erwähnten Mikroben zusammenballende Eigenschaft verloren hat. Es existieren mehrere solche Kombinationen,

bei denen ein Alexin von sensibilisierten Blutkörperchen genommen wird, ohne daß die Blutkörperchen hämolysiert werden. Eine solche Kombination ist z. B. Pferdeserum und Meerschweinchenblutkörperchen [s. die Arbeiten von Bordet und Gay¹⁾, Bordet und Streng²⁾]. Das Rinderserum wieder verliert sein Alexin z. B. in Gegenwart von Ziegenblutkörperchen, ohne daß diese hämolysiert werden.

Um also ein alexinfreies Rinderserum zu erhalten, habe ich z. B. eine Tube mit 0,4 ccm frischen Rinderserums + 2 ccm physiologischer Kochsalzlösung versetzt und diese Flüssigkeit zu einem durch Zentrifugieren erhaltenen gewaschenen Bodensatz von 0,8 ccm Ziegenblut gebracht. Nach 2 Stunden langem Kontakt habe ich die Flüssigkeit von den stark zusammengeballten Blutkörperchen abzentrifugiert. Diese Flüssigkeit mag Flüssigkeit A genannt werden. Die Flüssigkeit B enthält eine gleichzeitig mit A gemachte Mischung von 0,4 ccm frischen Rinderserums und 2 ccm physiologischer Kochsalzlösung.

Jetzt wurden folgende 4 Tuben bereitet:

- 1) 1 ccm Flüssigkeit A + 0,05 ccm Meerschweinchenblutkörperchen
- 2) 1 " " B + 0,05 "
- 3) 1 " " A + $\frac{1}{2}$ ccm Diphtheriebacillenaufschwemmung
- 4) 1 " " B + $\frac{1}{2}$ " "

Läßt man die Tuben durch $\frac{1}{2}$ Stunde im Thermostaten bei 37°, so kann man in den Tuben 1 und 3 keine Veränderung beobachten. Die Blutkörperchen in Tube 1 waren intakt, die Mikroben in Tube 3 nicht zusammengeballt worden. Dagegen trat in Tube 2, welche die ersten 15 Minuten keine Wirkung zeigte, plötzlich nach ca. 20 Minuten eine sehr starke Zusammenballung ein, welche von Hämolyse gefolgt wurde, so daß die Blutkörperchen in $\frac{1}{2}$ Stunde total hämolysiert waren. Die Tube 4 zeigte eine sehr starke charakteristische Zusammenballung.

Durch den vorhergehenden Kontakt mit den Ziegenblutkörperchen wurden die Sensibilisatoren des Rinderserums für Ziegenblutkörperchen abgegeben, die Blutkörperchen nahmen das Alexin auf, so daß die Flüssigkeit A alexinfrei wurde. Dieser Umstand genügt, um den Ausgang des Versuches zu erklären. Tube I enthielt nicht mehr Alexin, die Blutkörperchen blieben intakt; in Tube II war das Alexin zurückgeblieben, die Blutkörperchen wurden hämolysiert, in Tube III trat aus demselben Grunde keine Zusammenballung ein, während in Tube IV, wo das Alexin vorhanden war, eine sehr deutliche Reaktion entstand. Ähnliche Resultate zeigten die Tuberkelbacillen.

Aus allen diesen Versuchen geht klar hervor, daß für die zu besprechende Zusammenballung der Diphtherie- und Tuberkelbacillen durch Rinderserum das Alexin unbedingt notwendig ist, und daß es dabei gleichgültig ist, durch welches Alexin das inaktive Rinderserum wieder aktiv gemacht wird. Damit ist natürlich nicht ausgeschlossen, daß Tuberkel- und Diphtheriebacillen existieren können, bei welchen auch Agglutinine in gewöhnlichem Sinne im Rinderserum vorhanden sind. Durch diese Versuche ist nur bewiesen, daß eine Zusammenballung dieser Mikroben existiert, für die, ganz wie für die Hämolyse der Blutkörperchen, die Gegenwart eines Alexins eine Vorbedingung ist.

Aus dem zuletzt angeführten Versuch geht weiter hervor, daß das-

1) Bordet u. Gay, a. a. O.

2) Bordet u. Streng, a. a. O.

selbe Alexin¹⁾, welches für die Hämolyse notwendig war, auch für die hier zu besprechende Zusammenballung der Mikroben notwendig ist. Daß das Alexin allein nicht die Reaktion hervorruft, geht aus den früher angeführten Versuchen hervor.

2) Ausschaltung der Sensibilisatoren.

Ist die Sensibilisierung der Mikroben notwendig, um die jetzt zu besprechende Zusammenballung hervorzurufen? Treten diese Erscheinungen hervor, wenn die Sensibilisatoren des Rinderserums ausgeschaltet werden, und können in diesem Falle andere Sensibilisatoren den Rindersensibilisator ersetzen?

Um eine Antwort auf diese Frage zu finden, habe ich inaktives Rinderserum durch Kontakt mit den zwei oben genannten Mikroben seiner entsprechenden Sensibilisatoren beraubt und die Wirkung dieser erschöpften Sera mit der der nicht vorbehandelten inaktiven Rindersera verglichen. Um sicher zu sein, daß die entsprechenden Sensibilisatoren wirklich ganz entfernt worden sind, habe ich große Mengen von Mikroben in Kontakt mit Rinderserum gebracht. Aus einer Tube habe ich die ganze Diphtheriekultur auf Serum herausgenommen, in ca. 10 ccm physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmt und die Flüssigkeit dann durch Zentrifugieren und Dekantieren entfernt. Zu dem Bodensatz wurden 0,5 ccm Rinderserum zugefügt. Nach einem Kontakt von 3—4 Stunden habe ich die Flüssigkeit nach dem Zentrifugieren abpipettiert. Diese Flüssigkeit wurde mit A bezeichnet.

Auf ähnliche Weise habe ich das Rinderserum auch mit Tuberkelbacillen vom Typus bovinus behandelt. Die verwendeten Tuberkelbacillennengen waren approximativ dieselben wie die verwendeten Diphtheriebacillennengen. Der Kontakt wurde auch auf dieselbe Weise gemacht: 0,5 ccm Rinderserum zum Bodensatz von Mikroben. Für die Tuberkelbacillen mußte der Kontakt etwas länger dauern als für die Diphtheriebacillen. Ich hatte also zwei Rindersera, ein durch Diphtheriebacillen erschöpftes, A, und ein durch Tuberkelbacillen erschöpftes, B.

Mit diesen zwei Rindersera und mit nativem inaktiven Rinderserum machte ich u. a. folgende Mischungen:

Tube 1. 0,5 ccm ähnlicher Diphtheriebacillenemulsion wie früher + 0,3 ccm physiologischer Kochsalzlösung + 0,1 ccm Meerschweinchenalexin.

Tube 2. 0,5 ccm von derselben Diphtheriebacillenemulsion + 0,3 ccm physiologischer Kochsalzlösung + 0,1 ccm Meerschweinchenalexin + 0,1 ccm inaktiven Rinderserums.

Tube 3. 0,5 ccm von derselben Diphtheriebacillenemulsion + 0,3 ccm physiologischer Kochsalzlösung + 0,1 ccm Meerschweinchenalexin + 0,1 ccm Serum A.

Tube 4. 0,5 ccm von derselben Diphtheriebacillenemulsion + 0,3 ccm physiologischer Kochsalzlösung + 0,1 ccm inaktiven Rinderserums.

Tube 5. 0,5 ccm von derselben Diphtheriebacillenemulsion + 0,3 ccm physiologischer Kochsalzlösung + 0,1 ccm Rinderserum A.

Wenn diese Tuben im Thermostaten bei 37 ° C standen oder geschüttelt wurden, so entstand in den Tuben 1, 3, 4 und 5 keine Zusammenballung; in Tube 2 trat aber schon nach 1/2 Stunde eine sehr deutliche Zusammenballung ein.

Ein ähnlicher Versuch mit Tuberkelbacillen, Typus bovinus, und dem Rinderserum B ergab dasselbe Resultat. Die Mischungen wurden sonst ganz wie in dem Versuche mit Diphtheriebacillen gemacht. In den Tuben 1,

1) Dieser Versuch ist gewissermaßen ein Beweis für die Unität der Alexine.

3, 4 und 5 war nichts zu sehen; dagegen trat nach ca. 15 Minuten in der Tube 2 eine sehr charakteristische Zusammenballung hervor.

Diese Versuche zeigen unzweideutig, daß die Sensibilisatoren des Rinderserums in dieser Kombination notwendig sind, um das Alexin zu binden und die Reaktion herbeizuführen.

Aus den angeführten Versuchen geht weiter hervor, daß die Sensibilisatoren des Rinderserums direkt, ohne Gegenwart von Alexin, von den Mikroben aufgenommen werden, ganz wie es Bordet und Gay, Bordet und Ströng¹⁾ gezeigt haben, daß die Blutkörperchen direkt ohne Gegenwart von Alexin die Sensibilisatoren des Rinderserums aufnehmen. Diese Versuche mit den Mikroben zeigen also, daß die Sensibilisatoren des Rinderserums nicht, wie Ehrlich und Sachs²⁾, Sachs und Bauer³⁾ auf Grund ihrer Versuche mit den Blutkörperchen es behaupten, die Gegenwart des Alexins brauchen, um gebunden zu werden. Diese Sensibilisatoren verhalten sich also vollständig in derselben Weise wie alle anderen Sensibilisatoren. Der Beweis, den Ehrlich und Sachs gegen die Sensibilisatortheorie von Bordet in dem von ihnen angenommenen oben erwähnten speziellen Verhalten des Rinderserums sehen wollen, hat sich also auch durch diese meine Versuche als unrichtig gezeigt.

In dem oben angeführten Beispiele wurden die Diphtherie- und Tuberkelbacillen in Gegenwart von Alexin sehr stark durch inaktives Rinderserum, welches seiner Sensibilisatoren nicht beraubt worden war, zusammengeballt, während dieselben gar nicht ausgeflockt wurden, wenn das inaktive Rinderserum durch vorhergehenden Kontakt seiner Sensibilisatoren beraubt worden war.

Wenn man ähnliche Versuche mit Typhusbacillen macht, treten die Unterschiede nicht so deutlich auf. Ein Unterschied kann kaum bemerkt werden, was aber darin seinen Grund hat, daß das Rinderserum nur schwache Sensibilisatoren gegen den von mir benutzten Typhusstamm enthielt. Doch bekam man auch mit diesen Mikroben bei Gegenwart von Alexin eine deutliche, obwohl langsamere Verstärkung der Zusammenballung, wenn größere Mengen als 0,2 ccm nativen inaktivierten Rinderserums verwendet wurden. Gar keine Reaktion entsteht auch mit diesen großen Rinderserummengen, wenn man durch Typhusbacillen vorbehandeltes, also sensibilisatorenfreies Rinderserum verwendet. Daß die Schwäche der Sensibilisatoren des Rinderserums die Ursache der schwachen Reaktion dieser Mikroben ist, geht aus dem folgenden Versuche hervor, wo ich die Normalsensibilisatoren durch Immunsensibilisatoren ersetzt habe. Dann geben auch die Typhusbacillen eine sehr starke Reaktion, ganz wie Diphtherie- und Tuberkelbacillen.

Ich habe in dem folgenden Versuche den Rindersensibilisator durch einen Immunsensibilisator, nämlich ein altes Typhusimmunserum vom Pferde, welches in den von mir benutzten großen Dosen keine Agglutination zeigte, ersetzt.

Der Versuch wurde in folgender Weise angestellt:

Tube 1. 0,5 ccm Typhusbouillonkultur + 0,3 ccm physiologischer Kochsalzlösung + 0,1 ccm Meerschweinchenalexin.

Tube 2. 0,5 ccm derselben Kultur + 0,3 ccm physiologischer Kochsalzlösung + 0,1 ccm Meerschweinchenalexin + 0,1 ccm inaktiven Typhusimmunserums.

1) Bordet u. Ströng, a. a. O.

2) Ehrlich u. Sachs, a. a. O.

3) Sachs u. Bauer, a. a. O.

Tube 3. 0,5 ccm derselben Kultur + 0,3 ccm physiologischer Kochsalzlösung + 0,1 ccm inaktiven Typhusimmunserums.

Tube 4. 0,5 ccm derselben Kultur + 0,3 ccm physiologischer Kochsalzlösung + 0,1 ccm Meerschweinchenalexin + 0,1 ccm inaktiven Typhusimmunserums + 0,2 ccm inaktiven nativen Rinderserums.

Tube 5. 0,5 ccm von derselben Kultur + 0,3 ccm physiologischer Kochsalzlösung + 0,1 ccm Meerschweinchenalexin + 0,1 ccm inaktiven Typhusimmunserums + 0,2 ccm durch Typhusbacillen erschöpften Rinderserums.

Tube 6. 0,5 ccm derselben Kultur + 0,3 ccm physiologischer Kochsalzlösung + 0,1 ccm inaktiven Typhusimmunserums + 0,2 ccm inaktiven erschöpften Rinderserums.

Tube 7. 0,5 ccm derselben Kultur + 0,3 ccm physiologischer Kochsalzlösung + 0,2 ccm inaktiven erschöpften Rinderserums.

Tube 8. 0,5 ccm derselben Kultur + 0,3 ccm physiologischer Kochsalzlösung + 0,1 ccm Meerschweinchenalexin + 0,2 ccm inaktiven erschöpften Rinderserums.

Alle Tuben werden in den Thermostaten bei 37° C gestellt. Nach 15 Minuten bekommt man in den Tuben 4 und 5 eine sehr starke Zusammenballung. In den anderen Tuben erfolgt keine Veränderung, nicht einmal nach mehreren Stunden.

Wie ist dieses Resultat zu verstehen?

Tube 1 zeigt, daß das Alexin allein keine Wirkung hat. Tube 7 zeigt, daß das durch Typhusbacillen erschöpfte Rinderserum auch ohne Wirkung ist.

In Tube 3 hatte das Typhusimmunserum vom Pferde in der verwendeten Dosis auch keine sichtbare Wirkung; in Tube 6 haben das erschöpfte Rinderserum und das spezifische Pferdeimmunserum auch zusammen keine sichtbare Wirkung. Tube 8 zeigt, daß das erschöpfte Rinderserum allein, auch bei Gegenwart von Alexin, keine Wirkung hat. In Tube 2 kann das nicht agglutinierende Immunserum allein bei Gegenwart von Alexin keine Zusammenballung hervorrufen.

Tube 5 dagegen zeigt, daß, wenn ein anderer genügend starker Sensibilisator anstatt des von dem Rinderserum durch vorhergehenden Kontakt entnommenen Rindersensibilisators zu der Mischung zugefügt wird, eine typische Zusammenballung bei Gegenwart von Alexin und Rinderkolloiden entsteht.

Die Tube 4, welche auf ähnliche Weise wie Tube 5 gemischt wurde, nur mit dem Unterschiede, daß anstatt des mittels Typhusbacillen erschöpften Rinderserums hier natives, inaktiviertes Rinderserum verwendet wurde, zeigt eine starke Reaktion, welche ebenso stark wie die in Tube 5 war. Der Immunsensibilisator hatte den schwachen Rindersensibilisator ersetzt.

In den jetzt angeführten Versuchen wurde ein ca. 1 Jahr altes Typhusimmunserum vom Pferde, welches in den angewendeten Dosen nicht agglutinierte, wohl aber in kleineren, als Sensibilisator benutzt. Um dem Einwand zu begegnen, daß es sich hier um eine Aktivierung der durch ein jahrelanges Stehen entstandenen Proagglutinoide im Sinne Shibayamas¹⁾ handelte, machte ich mit frischen Immunsera ähnliche Versuche und bekam vollständig analoge Resultate. Ich benutzte unter anderen als Immunsensibilisatorquelle ein inaktiviertes Serum von mit Typhusbacillen vorbehandelten Kaninchen. Bei dem Versuche muß man solches neues Serum, welches, auf 56° C erhitzt, keine Agglutinationshemmung in konzentrierten Dosen hervorruft, in so kleinen Mengen für den Versuch benutzen, daß man nur schwache oder keine Agglutination von dem Serum allein bekommt. Dann kann man leicht die durch das erschöpfte Rinderserum bei Gegenwart von Alexin

1) Shibayama, Centralbl. f. Bakt. etc. Abt. I. Orig. Bd. XLII. 1906.

hervorgerufene Reaktion von der gewöhnlichen Agglutination unterscheiden; aber auch beim Benutzen von ziemlich stark agglutinierenden Mengen des Immunserums kann man den Unterschied zwischen den zwei Reaktionen beobachten, besonders wenn man die zu vergleichenden Tuben von Zeit zu Zeit etwas schüttelt; die Agglutination tritt relativ schwach hervor, die durch Alexin und Rinderserum hervorgerufene Zusammenballung zeigt sich viel stärker und hat ein ganz anderes Aussehen.

Diese jetzt angeführten Versuche zeigen also, daß ein Normal- oder Immunsensibilisator nötig ist, um die eigentümliche, nicht mit der Agglutination zu verwechselnde Zusammenballung der Mikroben bei Gegenwart von Alexin und inaktivem Rinderserum hervorzurufen.

Auch in folgender Weise kann man zeigen, daß die Gegenwart des Alexins nicht genügt, um diese eigentümliche Zusammenballung hervorzurufen, sondern daß das Alexin gebunden werden muß, daß mit anderen Worten ein Sensibilisator vorhanden sein muß.

Typhusbacillen, gegen welche keine oder äußerst wenige Sensibilisatoren im Meerschweinchen- und Kaninchenserum existieren, wurden einerseits mit von Kaninchen stammendem, bei 56° inaktiviertem Immunserum, andererseits mit bei dieser Temperatur inaktiviertem normalen Kaninchenserum vorbehandelt. Diese Mikroben wurden nach genügendem Kontakt gut gewaschen und beiderseits in Kontakt mit Meerschweinchenalexin gebracht. Nach 1 Stunde dauerndem Kontakt wurden die so behandelten Mikroben wieder gewaschen und es wurde inaktives Rinderserum beiderseits zugefügt. Die sensibilisierten Mikroben hatten das Alexin aufgenommen, sie wurden mit Rinderserum stark ausgeflockt, die anderen nicht. Siehe folgenden Versuch:

In 6 Tuben wurden gleiche Mengen Typhusbacillen (1,0 ccm) aus 24-stündiger Bouillonkultur gebracht. Zu 3 von den Tuben, a, b und c, wurde 0,1 ccm sehr schwach agglutinierenden, durch Erhitzen auf 56° inaktivierten Typhusimmunserums von Kaninchen zugesetzt, zu den 3 anderen Tuben, d, e und f, ebensoviel normales inaktives Kaninchenserum. Nach $\frac{1}{2}$ Stunde wurden alle Tuben zentrifugiert, die Mikroben gewaschen und nachher jede Tube mit 1 ccm physiologischer Kochsalzlösung versetzt. Zu a, c, d und e wird 0,1 ccm Meerschweinchenalexin gegeben und die Tuben werden dann von Zeit zu Zeit gut geschüttelt, um eine möglichst gute Alexinbindung zu bekommen. Nach wieder 1 Stunde wird zentrifugiert, die Mikroben gewaschen und die Flüssigkeit zentrifugiert, abpipettiert und 1,0 ccm physiologischer Kochsalzlösung zugefügt. Zu den Tuben a, e, d und f werden 0,05 ccm Rinderserum zugesetzt, welches in dieser Menge nicht allein die Mikroben zusammenballt. Die anderen Tuben zeigen keine oder nur eine minimale Einwirkung des Rinderserums, nur in der Tube a, wo das Alexin durch vorhergehende Sensibilisierung gebunden wurde, entstand eine deutliche Reaktion. In der entsprechenden Tube d, wo das Alexin nicht gebunden wurde, weil keine Sensibilisatoren vorhanden waren, entstand keine Reaktion. Der Versuch zeigt weiter, daß da, wo die Sensibilisatoren gewirkt hatten, aber kein Alexin, also in der Tube c, das inaktivierte Rinderserum auch keine Wirkung hatte. Das Alexin muß also gebunden werden, um diese eigentümliche Zusammenballung hervorzurufen, und weiter genügt die Sensibilisierung durch Immunserum nicht, um die Reaktion ohne Gegenwart von Alexin durch inaktives Rinderserum herbeizuführen.

Ist es aber auch nötig, daß die Kolloidstoffe des Rinderserums anwesend sind, um diese Zusammenballung hervorzurufen?

Wie ich in einem bald erscheinenden Aufsatz zeigen werde, existieren in einer großen Anzahl verschiedener anderer Sera ähnliche Stoffe wie die Kolloidstoffe des Rinderserums, aber unter den gewöhnlich in den Laboratorien benutzten Tieren hat das Rinderserum solche in größter Menge, so daß die Wirkung dieser Stoffe am leichtesten beim Rinderserum zu sehen ist.

Um diese eigenartige, von mir gefundene Zusammenballung der Mikroben nicht mit der Agglutination zu verwechseln, schlage ich für sie den Namen Konglutination vor, also denselben Namen, welchen Bordet und Streng für ähnliche Zusammenballungen bei Blutkörperchen vorgeschlagen haben. Wie Bordet und Streng für die die Konglutination der Blutkörperchen hervorrufenden kolloiden Stoffe den Namen Konglutinin vorgeschlagen haben, will ich denselben Namen Konglutinin auch für die Bestandteile des Rinderserums, die nur bei Gegenwart von Alexin und Sensibilisator eine Zusammenballung der Mikroben hervorrufen, benutzen. Die auf Mikroben und die auf Blutkörperchen wirkenden kolloiden Stoffe müssen ja doch als vollständig analog, wahrscheinlich auch als identisch betrachtet werden.

3) Weitere Unterschiede zwischen Konglutininen und Agglutininen.

Um die Unterschiede zwischen Konglutininen und Konglutination einerseits und Agglutininen und Agglutination andererseits festzustellen, habe ich noch folgende vervollständigende Versuche ausgeführt:

a) Kann das Konglutinin durch Agglutinin ersetzt werden?

Folgender Versuch, wo ein durch vorhergehenden Kontakt mit Typhusbacillen seiner entsprechenden Sensibilisatoren beraubtes inaktives Rinderserum benutzt worden war, wurde mit einer 24 Stunden alten Typhusbouillonkultur angestellt.

Tube 1: 0,5 ccm Typhusbouillonkultur + 0,3 ccm physiologischer Kochsalzlösung + 0,1 ccm Meerschweinchenalexin.

Tube 2: 0,5 ccm Typhusbouillonkultur + 0,3 ccm physiologischer Kochsalzlösung + 0,05 ccm inakt. Typhusimmunserum von Kaninchen + 0,1 ccm Meerschweinchenalexin.

Tube 3: 0,5 ccm Typhusbouillonkultur + 0,3 ccm physiologischer Kochsalzlösung + 0,1 ccm inakt. Typhusimmunserum von Kaninchen + 0,1 ccm Meerschweinchenalexin.

Tube 4: 0,5 ccm Typhusbouillonkultur + 0,3 ccm physiologischer Kochsalzlösung + 0,2 ccm inakt. Typhusimmunserum von Kaninchen + 0,1 ccm Meerschweinchenalexin.

Tube 5: 0,5 ccm Typhusbouillonkultur + 0,3 ccm physiologischer Kochsalzlösung + 0,05 ccm inakt. Typhusimmunserum von Kaninchen + 0,1 ccm Meerschweinchenalexin + 0,1 ccm inaktiven erschöpften Rinderserums.

Tube 6: 0,5 ccm Typhusbouillonkultur + 0,3 ccm physiologischer Kochsalzlösung + 0,1 ccm inaktiven erschöpften Rinderserums.

Tube 7: 0,5 ccm Typhusbouillonkultur + 0,3 ccm physiologischer Kochsalzlösung + 0,05 ccm inakt. Typhusimmunserum von Kaninchen.

Tube 8: 0,5 ccm Typhusbouillonkultur + 0,3 ccm physiologischer Kochsalzlösung + 0,1 ccm inakt. Typhusimmunserum von Kaninchen.

Tube 9: 0,5 ccm Typhusbouillonkultur + 0,3 ccm physiologischer Kochsalzlösung + 0,2 ccm inakt. Typhusimmunserum von Kaninchen.

Alle Tuben werden in den Thermostaten bei 37 ° C gestellt und von Zeit zu Zeit gleichzeitig und gleichviel geschüttelt.

Die Tuben 1 und 6 zeigen keine Veränderung; die Tuben 7, 8 und 9 zeigen nach 20 Minuten eine Agglutination, welche gar nicht stärker

wird bei Gegenwart von Alexin; die entsprechenden mit Alexin versetzten Tuben 2, 3 und 4 weisen bedeutend später und schwächer eine Zusammenballung auf. Dagegen zeigt Tube 5 eine mit den anderen gar nicht vergleichbare Zusammenballung schon nach 10 Minuten. Der einzige Unterschied zwischen Tube 2 und Tube 5 war, daß hier, in Tube 5, auch inaktives, von eventuellen Sensibilisatoren und Agglutininen befreites Rinderserum vorhanden war. Obwohl die zusammenballende Substanz des Rinderserums allein keine sichtbare Wirkung hat, Tube 6, wirkt es doch unter den gegebenen Bedingungen, d. h. bei Gegenwart von Sensibilisatoren und Alexinen, so stark, daß das Rinderserum nicht durch ein anderes, deutlich agglutinierendes Serum von Kaninchen, nicht einmal durch etwas größere Dosen dieses Serums (Tube 3, 4) ersetzt werden kann.

b) Die Agglutinine eines Serums werden durch Kontakt mit nicht vorbehandelten Mikroben aus dem Serum absorbiert. Kann man mit solchen Mikroben, d. h. mit nicht sensibilisierten und nicht alexinierten Mikroben auch die Konglutinine aus dem Serum entfernen? Um eine Antwort auf diese Frage zu bekommen, habe ich folgenden Versuch gemacht:

Ich habe das Sediment von 20 ccm Typhusbouillonkultur 3 Stunden auf 0,2 ccm Rinderserums + 0,8 ccm physiologischer Kochsalzlösung einwirken lassen. Das dann abzentrifugierte Rinderserum gab weder allein, noch zusammen mit Meerschweinchenalexin eine Reaktion gegenüber Typhusbacillen. Wie verhält sich nun ein solches erschöpftes Rinderserum und ein nicht erschöpftes Rinderserum gegenüber Typhusbacillen bei Gegenwart von Alexin und einem Typhusimmunsensibilisator von Kaninchenserum?

Es wurden z. B. folgende Mischungen gemacht:

Tube 1: 0,5 ccm Typhusbouillonkultur + 0,1 ccm Meerschweinchenalexin + 0,1 ccm Immunserum + 0,2 ccm nicht erschöpften Rinderserums + 0,8 ccm physiologischer Kochsalzlösung.

Tube 2: 0,5 ccm Typhusbouillonkultur + 0,1 ccm Meerschweinchenalexin + 0,1 ccm Immunserum + 0,2 ccm erschöpften Rinderserums + 0,8 ccm physiologischer Kochsalzlösung.

Tube 3: 0,5 ccm Typhusbouillonkultur + 0,1 ccm Meerschweinchenalexin + 0,1 ccm Immunserum + 0,8 ccm physiologischer Kochsalzlösung.

Nach 15 Minuten Aufenthalt im Thermostaten zeigten die Tuben 1 und 2 eine typische, starke Zusammenballung, die Tube 3 zeigte eine viel schwächere Reaktion.

Der Versuch zeigt, daß das Rinderserum seine kolloiden Substanzen durch Kontakt mit nativen Mikroben nicht verliert, vielmehr gibt das Rinderserum, sowohl wenn es vorher mit Typhusbacillen erschöpft worden ist, als auch wenn es gar nicht in Kontakt mit diesen Mikroben gewesen ist, eine gleich starke Reaktion, sobald nur ein Sensibilisator und Alexin vorhanden sind. Der Parallelismus mit den mit den Blutkörperchen erhaltenen Resultaten [Ehrlich und Sachs¹⁾, Sachs und Bauer²⁾, Bordet und Gay³⁾, Bordet und Streng⁴⁾] ist hier ein vollständiger. Wie Bordet und Gay, Bordet und Streng gezeigt haben, entziehen dagegen sensibilisierte und alexinierte Blutkörperchen die kolloiden Stoffe dem Rinderserum. Per analogiam kann man daraus wohl schließen, daß die sensibilisierten und alexinierten Mikroben das auch machen.

1) Ehrlich und Sachs, a. a. O.

2) Sachs und Bauer, a. a. O.

3) Bordet und Gay, a. a. O.

4) Bordet und Streng, a. a. O.

c) Wie verhalten sich die Agglutinine und wie die nur auf sensibilisierte und alexinierte Mikroben wirkenden Konglutinine gegen Dialyse?

Man weiß ja, daß die gewöhnlichen Agglutinine bei Dialyse nicht präzipitiert werden. Noch nach monatelanger Dialyse verbleiben sie zum größten Teile, bis zu 90 Proz. in Lösung [Widal¹⁾, Achard und Bensaude²⁾, Winterberg³⁾, Pick⁴⁾ u. a.]. Wie verhalten sich die auf Mikroben wirkenden Konglutinine? Kann man dieselben durch Dialyse von den Agglutininen trennen?

Inaktives Rinderserum wurde während 24 Stunden gegen Leitungswasser dialysiert, die Präzipitate durch Zentrifugieren von der Flüssigkeit getrennt und wieder in physiologischer Kochsalzlösung aufgelöst. Der Abguß wurde mittels konzentrierter Salzlösung wieder auf die physiologische Konzentration gebracht und diese beiden Flüssigkeiten wurden mittels physiologischer Kochsalzlösung auf dasselbe Volumen ergänzt. Die bei der Dialyse ausgefallenen, in physiologischer Kochsalzlösung wieder aufgelösten Stoffe enthaltende Flüssigkeit wird mit A bezeichnet, der Abguß mit B.

Wie erwähnt, existiert im Rinderserum sowohl gegenüber Typhus- wie auch gegenüber Coli-Bakterien ein wahres Agglutinin, welches man dadurch nachweisen kann, daß $\frac{1}{2}$ Stunde bei 56° C inaktiviertes Rinderserum, welches also nicht mehr Alexin enthält, noch diese Mikroben zusammenballt. Welche von den beiden Flüssigkeiten A und B enthält nun das Agglutinin gegenüber den Typhus- und Colibacillen?

4 Tuben werden z. B. in folgender Weise beschickt:

- | | | | | | |
|----|-----|---------------------------|-------|-------------|---|
| 1) | 0,5 | ccm Typhusabouillonkultur | + 0,3 | Flüssigkeit | A |
| 2) | 0,5 | " " | + 0,3 | " | B |
| 3) | 0,5 | " Colibouillonkultur | + 0,3 | " | A |
| 4) | 0,5 | " " | + 0,3 | " | B |

Alle Tuben werden in den Thermostaten bei 37° C gestellt. Als Resultat ergibt sich, daß von der Flüssigkeit A weder Typhus- noch Colibacillen agglutiniert werden, wogegen die 2 Tuben mit der Flüssigkeit B eine deutliche Reaktion zeigen. Die Agglutinine des Rinderserums bleiben also nach der 24-stündigen Dialyse noch gelöst in dem Serum. Die bei der Dialyse unlöslichen Stoffe enthalten keine oder nur so geringe Mengen von Agglutinin, daß sie mit den in Lösung gebliebenen nicht vergleichbar sind.

Wenn diese oft erwähnte spezielle Zusammenballung der Mikroben durch Agglutinine hervorgerufen und diese Reaktion nur so aufzufassen wäre, daß die Mikroben durch Sensibilisierung und Alexinaufnahme so empfindlich gegenüber auch geringen Spuren von Rinder-Agglutinin geworden wären, daß sie unter diesen Bedingungen die eigentümliche Reaktion zeigten, so müßte der bei der Dialyse erhaltene Teil des Rinder-serums, welcher fast alles oder wenigstens das allermeiste Agglutinin des Rinder-serums enthielt, d. h. die Flüssigkeit B, eine stärkere Reaktion zeigen bei Gegenwart von dem zu dieser Reaktion notwendigen Alexin und Sensibilisator als die Flüssigkeit A, die keine Agglutinine enthielt. Der Versuch ergibt aber gerade das entgegengesetzte Verhalten.

Beschicken wir wieder die 4 Tuben wie oben und fügen wir zu den Mikroben noch entsprechende Immunsera + Alexin hinzu. Als Immun-

- 1) **Widal**, ref. v. Paltauf, Handb. d. path. Mikroorg. Kolle-Wassermann.
- 2) **Achard** und **Bensaude**, Thèse. Paris 1897.
- 3) **Winterberg**, Zeitschr. f. Hyg. 1899.
- 4) **Pick**, Hofmeisters Beiträge, Bd. I. 1901.

serum wurde auf 56° C erhitztes Typhus- und Coli-Immunserum von Kaninchen benutzt, als Alexin Meerschweinchenserum.

Tube 1	0,5 ccm Typhusbouillonkult.	+ 0,05 Typhusimmuns.	+ 0,1 Alexin	+ 0,3 Flüssigk.	A	
"	2 0,5 "	"	+ 0,05 "	+ 0,1 "	+ 0,3 "	B
"	3 0,5 " Colibouillonkultur	+ 0,05 Coliimmunser.	+ 0,1 "	+ 0,3 "	"	A
"	4 0,5 "	"	+ 0,05 "	+ 0,1 "	+ 0,3 "	B

Die Tuben werden dann in den Thermostaten bei 37° C gestellt. Die Tuben 1 und 3 wiesen eine sehr starke Zusammenballung auf; in den Tuben 2 und 4 konnte keine Reaktion beobachtet werden.

Als Resultat ergibt sich also, daß der unlösliche Teil des Rinderserums, welcher gar kein Agglutinin enthält, die Zusammenballung bei Gegenwart von Alexin gibt. Dieses gekreuzte Verhalten der zwei Teile des Rinderserums beweist meines Erachtens, daß die gewöhnlichen Agglutinine und die bei den Mikroben wirksamen kolloiden Substanzen, die Konglutinine, vollständig verschieden sind.

d) Wir wissen, daß die Gegenwart von Alexin eine Vorbedingung für die Konglutination ist.

Welche Wirkung hat die Gegenwart der Alexine auf die Agglutination?

Weil ich bald eingehend meine Versuche über diese Frage, Hemmung der Agglutination durch Komplemente publizieren werde, will ich nur den folgenden gleichzeitig mit den oben angeführten gemachten Versuch hier wiedergeben:

Präparieren wir z. B. folgende Tuben:

Tube 1. 0,5 ccm Typhusbouillonkultur + 0,05 ccm Typhusimmunagglutinin von Kaninchen + 0,1 ccm Meerschweinchenalexin.

Tube 2. 0,5 ccm Typhusbouillonkultur + 0,05 ccm Typhusimmunserum von Kaninchen + 0,1 ccm inaktiven Serums von demselben Meerschweinchen.

Tube 3. 0,5 ccm Colibouillonkultur + 0,05 ccm Coliimmunagglutinin von Kaninchen + 0,1 ccm Meerschweinchenalexin.

Tube 4. 0,5 ccm Colibouillonkultur + 0,05 ccm Coliimmunagglutinin von Kaninchen + 0,1 ccm inaktiven Serums von demselben Meerschweinchen.

Die Tuben werden alle in den Thermostaten bei 37° C gestellt. Die Tuben 2 und 4 zeigen schnell, in 1 Stunde, Agglutination, die Tuben 1 und 3 geben, wenn das benutzte Immunagglutinin nicht besonders stark ist, keine Reaktion und jedenfalls immer eine bedeutend schwächere als die Tuben 2 und 4.

Der Versuch zeigt also, daß die Gegenwart von Alexin, welche für das Entstehen der von mir bei den Mikroben gefundenen besonderen Zusammenballung eine *Conditio sine qua non* war, auf die Agglutinationserscheinung hindernd wirkt.

Die Konglutination ist also nicht als ein Ausdruck für die durch Sensibilisierung und Alexinaufnahme vergrößerte Empfindlichkeit der Mikroben gegen die Agglutinine des Rinderserums zu verstehen.

e) Wenn die Konglutination nur als eine verstärkte Agglutination aufzufassen wäre, so müßte man wohl auch zugeben, daß die beiden Phänomene, Agglutination und Konglutination, immer parallel gehen müßten, d. h. da, wo eine Agglutination stärker entsteht, müßte auch eine stärkere Konglutination entstehen. Dies ist aber nicht der Fall. Bordet und Streng machen auf Divergenzen in dieser Hinsicht bei den Blutkörperchen aufmerksam, und ich verweise den Leser deswegen

auf die letztgenannte Arbeit. Auch bei den Mikroben kann man Beispiele solcher Divergenzen zwischen Agglutination und Konglutination zeigen.

Das inaktive Rinderserum agglutiniert z. B. in einer Dosis von 0,3 ccm deutlich Typhus- und Coli-Bacillen, bewirkt aber keine Agglutination von Tuberkel- und Diphtheriebacillen. Das Rinderserum wirkt also durch seine Agglutinine bedeutend stärker auf Typhus- und Coli-Bacillen als auf Diphtherie- und Tuberkelbacillen. Gibt man aber zu dieser Dosis 0,3 ccm inaktiven Rinderserums noch 0,1 ccm Meerschweinchenalexins, so bekommt man mit dieser Mischung vollständig entgegengesetzte Resultate. In diesem Falle geben die Diphtherie- und Tuberkelbacillen eine sehr starke Reaktion, die von mir benutzten Typhusbacillen aber nur wenig oder gar nicht stärkere Reaktion als mit inaktiviertem Rinderserum. Die Konglutination durch Rinderserum ist also für Diphtherie- und Tuberkelbacillen stärker als für die Typhusbacillen. Zu bemerken ist noch, daß das verwendete Meerschweinchenalexin weder auf Typhus- noch auf Diphtherie- und Tuberkelbacillen eine sichtbare Wirkung ausübte.

Diese Inkongruenz zwischen Agglutination und Konglutination wäre nicht zu erklären, wenn die Konglutination nur eine Verstärkung der Agglutination wäre.

Die Konglutinationsreaktion als serodiagnostisches Hilfsmittel.

Hat die Konglutinationsreaktion einen praktischen Wert insofern, daß man mittels derselben eine Sero-diagnose stellen könnte, und kann man weiter mit Hilfe der Konglutination die sensibilisierende, d. h. die immunisierende Stärke eines Serums bestimmen?

Weil eine Sensibilisierung der Mikroben eine Vorbedingung der Konglutination ist, so folgt daraus auch, daß die Konglutination spezifisch sein muß, ganz so wie die Sensibilisatoren spezifisch sind.

Der praktische Wert der Konglutination hängt aber davon ab, ob dieselbe empfindlich genug ist, um eine Diagnose zu ermöglichen.

Um eine Antwort auf diese Frage zu erhalten, habe ich bei zwei verwandten Bakterien die Konglutination untersucht, und habe deshalb die Typhus- und Coli-Bacillen miteinander verglichen.

Zwei verschiedene Kaninchen wurden immunisiert, das eine mit *B. typhi*, das andere mit *B. coli*; 10 Tage nach der letzten Injektion wurde aus beiden Serum entnommen und bei 56° C inaktiviert. Beide Sera wirkten fast gleich stark agglutinierend auf ihre resp. Mikroben.

Gleichzeitig wollte ich noch das sensibilisierende Vermögen eines dritten, ganz verschiedenen Serums mit diesen zwei Sera nach ihrer Wirkung auf Typhus- und Coli-Bacillen vergleichen. Deshalb wurde inaktives Serum von einem mit den Bordet-Gengouschen Pertussismikroben immunisierten Pferde mit den anderen bezüglich seiner Wirkung gleichzeitig untersucht.

Als Alexinquelle wurde Meerschweinchenalexin verwendet, welches in den verwendeten Dosen weder Coli- noch Typhusbacillen agglutinierte. Das inaktive Rinderserum wurde in einer Menge von 0,05 ccm benutzt, welche Menge keine sichtbare Wirkung auf die von mir verwendeten Mikroben ausübte. Das agglutinierende Serum wurde in Dosen von 0,01 ccm angewendet.

Es wurden z. B. folgende Mischungen angefertigt:

ccm	ccm	ccm		
1) 0,5 Typhusbouillonkult.	+ 0,1 Alexin	+ 0,01 Typhusimmunser.		
2) 0,5 "	+ 0,1 "	+ 0,01 Coliimmunser.		
3) 0,5 "	+ 0,1 "	+ 0,01 Pertussisimmunser.		
4) 0,5 "	+ 0,1 "	+ 0,01 norm. inakt. Kaninchenser.		
5) 0,5 "	+ 0,1 "	+ 0,01 Typhusimmunser.	+ 0,05 inakt. Rinders.	
6) 0,5 "	+ 0,1 "	+ 0,01 Coliimmunser.	+ 0,05 "	"
7) 0,5 "	+ 0,1 "	+ 0,01 Pertussisimmuns.	+ 0,05 "	"
8) 0,5 "	+ 0,1 "	+ 0,01 norm. inakt. Kan.-Ser.	+ 0,05 "	"
9) 0,5 "	kein Alexin	+ 0,01 Typhusimmunser.		
10) 0,5 "	" "	+ 0,01 Coliimmunser.		
11) 0,5 "	" "	+ 0,01 Pertussisimmuns.		
12) 0,5 "	" "	+ 0,01 norm. intakt. Kaninchenser.		

Nach $\frac{1}{2}$ Stunde Verweilens im Thermostaten bei 37°C zeigte Tube 5 eine starke Zusammenballung, Tube 9 eine damit gar nicht vergleichbare schwache Ausflockung. Die anderen Tuben zeigten gar keine Reaktion. Die Tube 9 zeigt die Spezifität der Agglutination, Tube 5 die Spezifität der Konglutination. Der Unterschied zwischen Tube 5 einerseits und den Tuben 6, 7, 8 andererseits, in denen gar keine Reaktion zu sehen war, war also sehr frappant. Das Coli-Immunserum, Tube 6, zeigte keine Spur von Konglutination mit Typhus. Die Konglutationsreaktion erwies sich also als eine so spezifische Reaktion, daß so verwandte Mikroben und ihre Sera, wie die von mir benutzten Typhus- und Colibakterien, voneinander unterschieden werden konnten.

Ein ähnlicher Versuch mit Coli-Bacillen, wo als sensibilisierende Sera Typhus-, Coli- und normale Kaninchensera benutzt wurden, gab ein etwas abweichendes Resultat. Auch hier trat die stärkste Konglutination mit dem entsprechenden Serum, also in diesem Falle mit Coliimmunserum, auf, aber auch das normale Kaninchenserum hat eine Reaktion ergeben, obwohl später und schwächer. Auch dieses Resultat bestätigt die Spezifität der Konglutationsreaktion, zeigt aber auch gleichzeitig die Bedeutung der normal vorkommenden Sensibilisatoren gegenüber den saprophytischen Mikroben, in diesem Falle dem *B. coli*. Die Konglutination war zwar auch hier spezifisch, zeigt aber auch, daß zwischen Agglutininen und Konglutininen kein Parallelismus existiert, weil die benutzten Normalsera keine Agglutination, wohl aber eine deutliche Konglutination hervorriefen.

Hieraus kann man vielleicht schließen, daß die Konglutination ein besserer Ausdruck für den wirklichen Immunwert eines Serums, als die Agglutination sei.

Die normalen Tiere sind schon relativ unempfindlich gegenüber den saprophytischen *B. coli*, müssen also auch Sensibilisatoren gegen dieser Bacillus enthalten und demnach eine Konglutination zeigen.

Dieser Versuch mit *B. coli* zeigt auch deutlich die Nachteile der Konglutationsmethode. Die saprophytischen Mikroben sind durch Konglutination schwer zu unterscheiden, weil es in dem Normalserum verschiedener Tiere ziemlich starke Normalsensibilisatoren gibt, so daß man ein positives Resultat auch ohne Gegenwart von Immunsera bekommen kann.

Für die von mir benutzten Typhusbacillen existierten in normalen Kaninchen- und Meerschweinchenserum keine Normalsensibilisatoren, in Rinderserum scheint ein sehr schwacher Sensibilisator zu sein. Der normale Rindersensibilisator spielt in kleineren Mengen, weil er zu schwach ist, doch bei der Reaktion keine störende Rolle. Wenn man die

sensibilisierende Stärke eines Serums messen will, ist es doch am besten, daß man die eventuellen Sensibilisatoren des Rinderserums durch vorhergehenden Kontakt mit entsprechenden Mikroben wegnimmt.

Um die sensibilisierende Stärke eines Typhusimmunserums mit der eines Normalserums zu vergleichen, habe ich z. B. folgendes Verfahren befolgt: Das auf 56° C erhitzte Typhusimmunserum von Kaninchen und das ebenso auf 56° C erhitzte Serum von einem normalen Kaninchen wurden in fallenden Dosen in eine Reihe von Tuben gebracht. Zu allen diesen Tuben wurden gleiche Mengen Mikroben, 1,0 ccm + 0,25 ccm Meerschweinchenalexin + 0,25 ccm durch Erhitzen auf 56° C inaktivierten, mit Typhusbacillen vorher erschöpften Rinderserums zugefügt, welche Mischung allein keine Konglutination gab. In zwei parallelen Reihen habe ich das agglutinierende Vermögen beider Sera auf gewöhnliche Weise, d. h. ohne Alexin und inaktiviertes Rinderserum verglichen. Zu der Reihe A wurden also außer dem inaktiven Immunserum von Kaninchen auch Alexin und inaktives Rinderserum zugefügt, zu Reihe B inaktives normales Kaninchenserum + Alexin + inaktives Rinderserum.

Konglutination und Agglutination nach 1 Stunde bei 37°. Die Tuben werden nach je 10 Minuten stark geschüttelt¹⁾.

Serummenge	A Immunserum Konglutinations- stärke	B Norm. Serum Konglutinations- stärke	C Immunserum Agglutinations- stärke	D Norm. Serum Agglutinations- stärke
0,1	+++++	—	+++++	—
0,08	+++++	—	++++	—
0,065	++++	—	++++	—
0,05	++++	—	+++	—
0,04	++++	—	+++	—
0,033	++++	—	+++	—
0,025	++++	—	+++	—
0,020	++++	—	++	—
0,016	++++	—	++	—
0,012	++++	—	++	—
0,01	++++	—	+	—
0,008	++++	—	+	—
0,0065	++++	—	+	—
0,005	++++	—	+	—
0,004	++++	—	—	—
0,0033	++++	—	—	—
0,0025	++++	—	—	—
0,0020	+++	—	—	—
0,0016	+++	—	—	—
0,0012	+++	—	—	—
0,001	+++	—	—	—
0,0008	+++	—	—	—
0,00065	+++	—	—	—
0,0005	++	—	—	—
0,0004	++	—	—	—
0,00033	++	—	—	—
0,00025	++	—	—	—
0,0002	++	—	—	—
0,00016	++	—	—	—
0,00012	+	—	—	—
0,0001	+	—	—	—
0,00000	—	—	—	—

1) +++++ bedeutet sehr stark, ++++ ziemlich stark, +++ stark, ++ deutlich, + schwach, — Null.

Die Serien A und B zeigen also die konglutinierende Stärke der beiden zu vergleichenden Sera, die Serien C und D die agglutinierende Stärke derselben. In beiden Reihen wurde zu den Immuserumdosen so viel physiologische Kochsalzlösung zugefügt, daß die Flüssigkeitsmengen immer gleich groß waren.

Der Versuch zeigt, daß man auf diese Weise den sensibilisierenden Wert eines Typhusimmunserums messen kann und daß derselbe erheblich größer war, als der des Normalserums ist. Weiter geht aus dem Versuch hervor, daß in diesem von mir jetzt untersuchten Falle die Konglutinationsreaktion bei bedeutend kleineren Dosen als die Agglutination noch zu sehen ist.

Wenn man in ähnlicher Weise die sensibilisierende Stärke eines Coli-Immunserums von Kaninchen mit der des Normalkaninchens vergleichen will, so ist die Sache schwieriger, weil die Normalsera schon sensibilisierend wirken. Die normalen Rinderserumsensibilisatoren kann man ja immer durch vorhergehenden Kontakt mit Coli-Bacillen ausschalten. Schwierigkeiten macht der Umstand, daß auch das Meerschweinchen Serum einen Sensibilisator gegen *B. coli* zu enthalten scheint. Aus dem alexinhaltigen Serum kann man aber auch die Normal-sensibilisatoren teilweise ausschalten, wenn man das Serum ohne Kochsalzlösung in Kontakt mit den Mikroben bringt [Bordet u. Gay¹⁾] und nach nicht zu lange dauerndem Kontakt zentrifugiert. Dann kann man oft die sensibilisierende Stärke der zwei zu vergleichenden Sera, des Immun- und des Normalserums, auch bei den saprophytischen Mikroben, *B. coli*, durch die Einwirkung von fallenden Dosen austitrieren und so feststellen, ob und wieviel stärker die Sensibilisatoren durch die Immunisierung geworden sind.

Anstatt des Meerschweinchenalexins und inaktiven Rinderserums kann man auch frisches Rinderserum benützen. Doch muß man aus dem Rinderserum durch vorhergehenden Kontakt mit Coli-Bacillen die entsprechenden Sensibilisatoren entfernen. Dabei darf das Rinderserum nicht verdünnt werden, weil es dann bei diesem Kontakt auch sein Alexin verliert.

Wo es sich um eine Typhusdiagnose handelt, braucht man Alexin und Rinderserum gar nicht vorzubehandeln, die Reaktion wird ebenso einfach gemacht wie eine Widal-Probe. Man kann nämlich so kleine Rinderserummengen benutzen, daß die im Rinderserum eventuell vorkommenden Normalsensibilisatoren ohne Bedeutung sind. Doch kann ich noch nichts über die Verwendbarkeit der Methode für die Praxis aussagen, weil ich nur mit einem Typhusstamme gearbeitet und die die Reaktion nur in zwei Fällen von Typhus bei Menschen versucht habe, beidemale zwar mit positivem Resultate, während zwei normale Menschensera keine Reaktion gaben. Es muß künftigen Versuchen vorbehalten werden, die Verwertungsmöglichkeit der Methode für die Praxis zu untersuchen. A priori wäre es ja richtiger, aus dem Verhalten der Sensibilisatoren eine Diagnose zu stellen, als aus dem Verhalten der Agglutinine. Vielleicht könnten regelmäßig vorgenommene Messungen der Sensibilisatorenstärke, welche auf diese Weise mit Hilfe der Konglutination ausführbar sind, Auskunft darüber geben, wie schnell die Reaktion in den Anfangsstadien der Krankheit entsteht, und auch einen besseren Einblick in den Krankheitsverlauf und eine sicherere Prognosen-

1) Bordet u. Gay, Ann. de l'Inst. Pasteur. 1908.

möglichkeit für die Krankheit gestatten, als es die Agglutinationsmethode tut.

Eine wie große Bedeutung die saprophytische Natur eines Mikroben für die Konglutationsreaktion hat, geht aus folgendem Versuche mit Pertussismikroben hervor: In dem Pasteur-Institute in Brüssel wurden die von Bordet u. Gengou gefundenen Pertussiserreger monatelang auf zwei verschiedenen Nährböden gezüchtet¹⁾. Der eine Nährboden bestand aus einer Mischung von gleichen Teilen Agar und Kaninchenblut, der andere enthielt Agar und nur Spuren von Blut. Auf dem blutreichen Nährboden gezüchtet, hatte sich der Pertussiserreger virulent erhalten, auf dem blutarmen dagegen hatte der Bacillus seine Virulenz verloren. Auf Anregung des Herrn Dr. J. Bordet habe ich diese zwei Pertussisstämme auf ihre Konglutination geprüft.

Auf diese beiden Mikrobenstämme wirkte Kaninchenalexin allein nicht, normales inaktives Rinderserum wirkte, allein angewendet, auch nicht, beide zusammen riefen aber eine Konglutination hervor, aber nicht mit den beiden oben genannten Stämmen. Der virulente Stamm gab gar keine Reaktion, der avirulente gab eine starke Reaktion. Die Bakterienmengen waren 0,5 ccm, die Alexinmenge 0,1 ccm, das Rinderserum ebenfalls 0,1 ccm. Der virulente Stamm, welcher gar keine Reaktion mit dem Normalserum zeigte, gab aber eine sehr starke Konglutination, wenn 0,05 ccm inaktiven Pertussisimmunserums vom Pferde noch zugefügt wurden. Die Zusammenballung, welche das inaktive Pertussisimmunserum allein verursachte, war mit der Konglutationsreaktion nicht vergleichbar. Der Nährboden der Bakterien hatte also in diesem Falle eine ausschlaggebende Bedeutung für das Entstehen der Konglutination. War der Bacillus auf blutreichem Nährboden gezüchtet, so verblieb er virulent und gab nicht mit normalem Serum die Konglutination, welche dagegen deutlich entstand, wenn ein Immunserum zugefügt wurde; war der Bacillus aber, auf blutarmem Nährboden gezüchtet, saprophytisch geworden, gaben schon normale Sera eine Konglutination. Aus Mangel an Krankenmaterial habe ich den praktischen Wert der Konglutination für die Pertussisdiagnose nicht prüfen können.

Diese Versuche zeigen also ein ganz ähnliches Verhältnis zwischen den beiden Pertussisstämmen wie das früher beobachtete zwischen dem pathogenen *B. typhi* und dem saprophytischen *B. coli*. Vielleicht werden weitere Versuche eine Verallgemeinerung dieser Beobachtungen erlauben, so daß man mit Hilfe eines Immunserums ohne Tierversuche die Pathogenität der Mikroben messen, und entgegengesetzt mit pathogenen Mikroben dem Immunisierungswert eines Immunserums feststellen könnte.

Ich will noch über einige Versuche mit Tuberkulose und Cholera berichten.

Ich habe schon erwähnt, daß frisches Rinderserum die Tuberkelbacillen, Typus humanus und Typus bovinus, ausflockt, konglutiniert, weil in frischem Rinderserum Sensibilisatoren für den Typus humanus und Typus bovinus, Alexine und Konglutinine, existieren. Daraus folgt,

1) Für die Unterschiede zwischen diesen beiden Stämmen siehe Bordet, Bull. de l'Académie de médecine de Belg. Nov. 1908.

daß die Arloing-Courmontsche¹⁾ Agglutination der Tuberkelbacillen mittels Rinderserums nicht eine Agglutination, sondern wenigstens teilweise eine Konglutination gewesen ist. Wahrscheinlich haben diese Forscher bisweilen auch eine wirkliche Agglutination gesehen, hauptsächlich muß wohl doch die Zusammenballung der Tuberkelbacillen in ihren Versuchen mit Rinderserum eine Konglutinationsreaktion gewesen sein. Da aber die Konglutination nicht nur von der Stärke der Sensibilisatoren, sondern auch von der des Alexins abhängt, so ist auch klar, daß, wenn man ein einige Tage altes Rinderserum oder ein ganz frisches benützt, die Resultate verschieden ausfallen müssen. Ein einige Tage altes Rinderserum gibt, wie ich gesehen habe, mit Tuberkelbacillen in der Tat eine bedeutend schwächere Reaktion als ein ganz frisches. Dies beruht aber nicht nur darauf, daß die Alexinstärke beim Stehen abnimmt, auch das nicht erhitzte Konglutinin verliert beim Stehen an Stärke. Die Tatsache, daß diese zwei bei der Konglutination wirksamen Faktoren eines Serums sich schon in einigen Tagen in der Stärke verändern, könnte meines Erachtens teilweise die so verschiedenen Resultate erklären, zu welchen verschiedene Forscher, welche mit der Arloing u. Courmontschen Agglutination der Tuberkelbacillen gearbeitet haben, gekommen sind.

Noch mag auf eine nicht zu unterschätzende Fehlerquelle aufmerksam gemacht werden. Wie ich später zeigen werde, habe ich bei ganz frischen Rindersera von verschiedenen Tieren ziemlich große Variationen der Alexine und der Konglutininmengen gesehen. Auffallend ist die von mir bei Rindertuberkulose öfters beobachtete Schwäche des Konglutinins und Alexins. Es ist ja deshalb klar, daß, wenn man überhaupt das sogenannte „agglutinierende“ Vermögen verschiedener Rindersera auf Tuberkelbacillen untereinander vergleichen will, die Versuche nicht, wie es bisher geschah [Arloing u. Courmont²⁾, Beck u. Rabinowitsch³⁾ u. a.], wie einfache Agglutinationsversuche angestellt werden dürfen. Man muß ein indifferentes, nicht Sensibilisatorer enthaltendes Alexin als Alexinquelle benützen und die verschiedenen zu vergleichenden Sera in inaktiver Form in fallenden Mengen zu den Mikroben zusetzen. Als Resultat erhält man ja auch unter diesen Bedingungen nur die Summe der sensibilisierenden und konglutinierenden Wirkung der verschiedenen Sera. Wenn man aber noch zu allen untereinander zu vergleichenden Tuben normales, inaktives, von Sensibilisatoren befreites Rinderserum in genügender Menge zufügt, so spielen die Variationen des Konglutiningehaltes der verschiedenen zu untersuchenden Rindersera eine untergeordnete Rolle. Alle Tuben enthalten dann Konglutinin genug, um die Reaktion schnell hervorzurufen, sobald nur das zu untersuchende Serum genug Sensibilisatoren enthält. Ich habe nur eine geringe Anzahl von Tiersera so untersucht und als Alexinquell Meerschweinchen- und Kaninchenalexin, welche keine Sensibilisatoren für den von mir benützten Typus bovinus enthielten, verwendet; ich habe keinen sicheren Unterschied zwischen normalen und tuberkulösen Rindersera bei den auf diese Weise gemachten Versuchen konstatieren können. Doch sind meine Versuche zu wenig um zu bindenden Schlußsätzen zu berechtigen. Im allgemeinen genügt

1) Arloing et Courmont, Zeitschr. f. Tub. u. Heilstättenw. 1898. Deutsche med. Wochenschr. 1900. u. a.

2) Arloing u. Courmont, a. a. O.

3) Beck u. Rabinowitsch, Deutsche med. Wochenschr. 1901.

doch in meinen Versuchen kleinere Mengen von Serum, um die Reaktion herbeizuführen, wenn das Serum von tuberkulösen Tieren verwendet wurde, als wenn Serum von gesunden Tieren benützt wurde, doch scheint das Stadium der Tuberkulose dabei eine Rolle zu spielen.

Die von mir untersuchten Kälbersera enthielten kleinere Mengen von Konglutinin als die von erwachsenen Tieren. Das erklärt ohne weiteres, warum Arloing u. Courmont¹⁾ so selten eine Zusammenballung bei Kälbersera gesehen haben. Sie geben an, daß bei 50 Kälbern im Alter von 5—8 Wochen die Reaktion immer negativ ausfiel, während bei erwachsenen Tieren in 40 Fällen von 50 die Reaktion positiv war, obwohl die Tiere für gesund erklärt worden waren.

Beck u. Rabinowitsch²⁾ hatten bei 23 tuberkulosefreien Rindern positive Resultate 22mal, Ruitinga³⁾ erhielt immer positive Ergebnisse, Panisset⁴⁾ und de Gracia⁵⁾ kamen zu ähnlichen Resultaten. Auch Rissling⁶⁾ hat häufiger positive als negative Reaktion gesehen, unter 12 untersuchten Rindern 8mal. Rissling betont die Notwendigkeit, die Agglutination bei größeren Serumverdünnungen, nicht, wie es oft geschehen ist, nur in der Konzentration 1:5 oder 1:10 zu untersuchen. Es ist ja auch ohne weiteres klar, daß, je größere Verdünnungen untersucht werden, desto besser man die Konglutination vermeiden können wird. Aus meinen Versuchen geht also hervor, daß man den Wert oder die Wertlosigkeit der Arloing-Courmontschen Agglutinationsmethode nur unter Berücksichtigung der von mir bewiesenen Existenz der Konglutination der Tuberkelbacillen durch frisches Rinderserum von erwachsenen Tieren feststellen kann.

In Uebereinstimmung mit den bei tuberkulösem Rinderserum erhaltenen Resultaten habe ich auch zwischen normalem Menschenserum und tuberkulösem Menschenserum keinen Unterschied gefunden. Es scheinen sich in den tuberkulösen Menschensera keine oder wenigstens sehr schwache Sensibilisatoren zu bilden, ein Resultat, das sich vollständig mit früheren Untersuchungen deckt. Als Indikator wurde bei diesen Versuchen mit Menschensera eine Emulsion von dem Typus humanus verwendet. Hierbei war die Schwierigkeit größer als bei den Versuchen mit Rindersera, weil sowohl das von mir verwendete Meerschweinchen- wie das Kaninchenalexin einen Sensibilisator gegen den von mir benützten Typus humanus enthielt, während solche gegen den Typus bovinus nicht vorhanden waren. Meine Versuche waren doch auch hier so wenige und vorläufige, daß ich keine Ansicht über die Verwendbarkeit der Konglutination bei Tuberkulose aussprechen will.

Den oben genannten Unterschied zwischen den von mir benützten zwei Tuberkulostypen möchte ich speziell hervorheben, weil derselbe sehr deutlich war. Damit soll nicht gesagt werden, daß diese beiden Typen wirklich verschiedene Mikroben waren, mit anderen Worten, ich will es nicht als einen Beweis für die Richtigkeit der bekannten Auffassung Kochs betonen. Ich erwähne es nur als eine Tatsache, welche vielleicht von Interesse sein könnte.

1) Arloing u. Courmont, a. a. O.

2) Beck u. Rabinowitsch, a. a. O.

3) Ruitinga, Zeitschr. f. Tub. u. Heilstättenw. 1902.

4) Panisset, Rév. gén. de méd. vétér. 1905.

5) de Gracia, Berl. klin. Wochenschr. 1902.

6) Rissling, a. a. O.

Die zwei Tuberkuloseotypen wurden auf folgende Weise miteinander verglichen:

Inaktives Rinderserum wurde durch vorhergehenden 12-stündigen Kontakt mit großen Mengen (zwei ganzen Kartoffelglyzerinkulturen) von Tuberkelbacillen von dem Typus humanus und dem Typus bovinus in zwei Tuben seiner Sensibilisatoren beraubt. Mit diesen zwei erschöpften Rindersera und Meerschweinchenalexin wurde dann folgender Versuch gemacht:

Tube 1: 0,5 ccm Tuberkelbacillenemulsion, Typ. bov. + 0,1 ccm Meerschweinchenalexin.

Tube 2: 0,5 ccm Tuberkelbacillenemulsion, Typ. bov. + 0,1 ccm Meerschweinchenalexin + 0,1 ccm nat. inakt. Rinderserums.

Tube 3: 0,5 ccm Tuberkelbacillenemulsion, Typ. bov. + 0,1 ccm Meerschweinchenalexin + 0,1 ccm mit Typ. bov. erschöpften Rinderserums.

Tube 4: 0,5 ccm Tuberkelbacillenemulsion, Typ. bov. + 0,1 ccm nat. inakt. Rinderserums.

Tube 5: 0,5 ccm Tuberkelbacillenemulsion, Typ. bov. + 0,1 ccm mit Typ. bov. erschöpften Rinderserums.

In Tube 2 entstand eine starke Zusammenballung, eine Konglutination, in den anderen Tuben ist nichts zu sehen.

Ein ähnlicher Versuch mit Typus humanus ergab folgendes Resultat:

Tube 1: 0,5 ccm Tuberkelbacillenemulsion, Typ. human. + 0,1 ccm Meerschweinchenalexin.

Tube 2: 0,5 ccm Tuberkelbacillenemulsion, Typ. human. + 0,1 ccm Meerschweinchenalexin + 0,1 ccm nat. inakt. Rinderserums.

Tube 3: 0,5 ccm Tuberkelbacillenemulsion, Typ. human. + 0,1 ccm Meerschweinchenalexin + 0,1 ccm durch Typ. human. erschöpften Rinderserums.

Tube 4: 0,5 ccm Tuberkelbacillenemulsion, Typ. human. + 0,1 ccm nat. inakt. Rinderserums.

Tube 5: 0,5 ccm Tuberkelbacillenemulsion, Typ. human. + 0,1 ccm durch Typ. human. erschöpften Rinderserums.

Wie in den oben referierten Versuchen entstand auch hier in Tube 2 eine starke Konglutination, aber außerdem auch in Tube 3, obwohl etwas langsamer und später. In den anderen Tuben war nichts zu sehen.

Aus dem Versuche mit B. tub. Typ. bov. ergibt sich also, daß das Rinderserum durch die durch Typ. bov. erfolgte Erschöpfung seiner Sensibilisatoren vollständig beraubt wurde und daß das Meerschweinchenalexinserum keine Sensibilisatoren gegenüber diesem von mir untersuchten Typ. bov. enthielt.

Das Resultat des Versuches mit Typ. humanus könnte entweder so gedeutet werden, daß das Rinderserum durch den Kontakt seine Sensibilisatoren nicht in genügender Menge verloren hatte, oder so, daß das benutzte Meerschweinchenalexinserum einen Sensibilisator gegen diesen Typ. humanus hatte. Welche Erklärung war nun die richtige? Diese Frage suchte ich auf folgende Weise zu entscheiden:

Wenn das Meerschweinchenalexinserum einen Sensibilisator gegen den Typus humanus besitzt, so muß die Konglutination schneller entstehen, wenn man die Bacillen eine Zeitlang vorher in Kontakt mit diesem Serum bringt, so daß die Sensibilisatoren Zeit haben, einzuwirken und erst das Alexin zu binden, als wenn sogleich mit dem Meerschweinchenalexinserum auch das Rinderserum zu den Mikroben zu gefügt wird.

Von zwei Tuben 1 und 2, von denen jede 0,5 ccm Tuberkelbacillenemulsion, Typ. humanus enthielt, wurde Tube 1 mit 0,1 ccm Meerschweinchenalexin versetzt. Nach Kontakt von 1 Stunde wurde zu diese:

Tube 0,1 ccm mit Typ. humanus erschöpften Rinderserums und zu gleicher Zeit zu der Tube 2 0,1 ccm Meerschweinchenalexin und 0,1 ccm erschöpften Rinderserums, beide gleichzeitig, zugefügt.

Die Tube 1 zeigt, etwas geschüttelt, nach 5 Minuten Konglutination, die Tube 2, die ebenfalls geschüttelt wurde, gibt die Reaktion bedeutend später, nach ca. 20 Minuten. Die einzige mögliche Erklärungsweise ist, daß das Meerschweinchenalexin einen Sensibilisator für den B. tuberculosis Typ. humanus enthält.

Dies ist natürlich kein Beweis für einen Unterschied zwischen den beiden Bacillen im Sinne Kochs. Die Kulturen waren zwar auf ähnlichem Nährboden, Glycerinkartoffeln, die gleiche Zeit — 3 Wochen — gezüchtet und die Bacillenemulsionen gleich trübe geworden, aber doch können ja solche, vielleicht auf verschiedener Virulenz beruhende Unterschiede auch bei sonst ganz denselben Tuberkelbacillenstämmen existieren. Dieser Versuch soll nur einen Beweis dafür bieten, daß die Konglutinationsreaktion zum Studium der Sensibilisatoren verwendbar ist.

Da ich mit diesen 2 Tuberkelbacillentypen beim Untersuchen der Sensibilisatoren bei Menschentuberkulose ganz ähnliche Resultate bekam, möchte ich noch folgenden Parallelversuch anführen:

Untersucht wurden Sera von 3 tuberkulösen und 2 normalen Personen. Für alle diese Sera wurde dasselbe Meerschweinchenserum und Rinderserum benützt.

Tube 1: 0,5 ccm Tuberkelbacillenemulsion Typ. hum. + 0,1 ccm Meerschweinchenalexin.

Tube 2: 0,5 ccm Tuberkelbacillenemulsion Typ. hum. + 0,1 ccm Meerschweinchenalexin + 0,1 ccm normalen Menschenserums I + 0,1 ccm mit Typ. hum. erschöpften Rinderserums.

Tube 3: 0,5 ccm Tuberkelbacillenemulsion Typ. hum. + 0,1 ccm Meerschweinchenalexin + 0,1 ccm normalen Menschenserums II + 0,1 ccm mit Typ. hum. erschöpften Rinderserums.

Tube 4: 0,5 ccm Tuberkelbacillenemulsion Typ. hum. + 0,1 ccm Meerschweinchenalexin + 0,1 ccm tuberkulösen Menschenserums I + 0,1 ccm mit Typ. hum. erschöpften Rinderserums.

Tube 5: 0,5 ccm Tuberkelbacillenemulsion Typ. hum. + 0,1 ccm Meerschweinchenalexin + 0,1 ccm tuberkulösen Menschenserums II + 0,1 ccm mit Typ. hum. erschöpften Rinderserums.

Tube 6: 0,5 ccm Tuberkelbacillenemulsion Typ. hum. + 0,1 ccm Meerschweinchenalexin + 0,1 ccm tuberkulösen Menschenserums III + 0,1 ccm mit Typ. hum. erschöpften Rinderserums.

Tube 7: 0,5 ccm Tuberkelbacillenemulsion Typ. hum. + 0,1 ccm Meerschweinchenalexin + 0,1 ccm mit Typ. hum. erschöpften Rinderserums.

Tube 8: 0,5 ccm Tuberkelbacillenemulsion Typ. hum. + 0,1 ccm mit Typ. hum. erschöpften Rinderserums.

Alle Tuben, mit Ausnahme von 1 und 8, zeigten eine Konglutination, die in den Tuben 2, 3 und 5 vielleicht etwas stärker war als in den anderen. Doch war der Unterschied nicht deutlich und klar, sondern es bestand nur eine Differenz von einigen Minuten.

Mit Typ. bovinus ergab ein analoger Versuch folgendes Resultat:

Tube 1: 0,5 ccm Tuberkelbacillenemulsion Typ. bov. + 0,1 ccm Meerschweinchenalexin.

Tube 2: 0,5 ccm Tuberkelbacillenemulsion Typ. bov. + 0,1 ccm Meerschweinchenalexin + 0,1 ccm normalen Menschenserums I + 0,1 ccm mit Typ. bov. erschöpften Rinderserums.

Tube 3: 0,5 ccm Tuberkelbacillenemulsion Typ. bov. + 0,1 ccm Meerschweinchenalexin + 0,1 ccm normalen Menschenserums II + 0,1 ccm mit Typ. bov. erschöpften Rinderserums.

Tube 4: 0,5 ccm Tuberkelbacillenemulsion Typ. bov. + 0,1 ccm Meerschweinchenalexin + 0,1 ccm tuberkulösen Menschenserums I + 0,1 ccm mit Typ. bov. erschöpften Rinderserums.

Tube 5: 0,5 ccm Tuberkelbacillenemulsion Typ. bov. + 0,1 ccm Meerschweinchenalexin + 0,1 ccm tuberkulösen Menschenserums II + 0,1 ccm mit Typ. bov. erschöpften Rinderserums.

Tube 6: 0,5 ccm Tuberkelbacillenemulsion Typ. bov. + 0,1 ccm Meerschweinchenalexin + 0,1 ccm tuberkulösen Menschenserums III + 0,1 ccm mit Typ. bov. erschöpften Rinderserums.

Tube 7: 0,5 ccm Tuberkelbacillenemulsion Typ. bov. + 0,1 ccm Meerschweinchenalexin + 0,1 mit Typ. bov. erschöpften Rinderserums.

Tube 8: 0,5 ccm Tuberkelbacillenemulsion Typ. bov. + 0,1 mit Typ. bov. erschöpften Rinderserums.

Keine einzige Tube zeigte eine Reaktion.

Der Versuch zeigt, daß keines der von mir benützten Menschensera, ebensowenig wie das Meerschweinchen Serum einen Sensibilisator gegen den Typus bovinus enthielt. Für den Typus humanus enthielt das Meerschweinchenalexin Serum einen Sensibilisator, das Menschenserum aber nicht, da ja die Tube 7 eine ebenso starke Reaktion zeigte, wie die anderen.

Wie bekannt, werden bei dem Pfeifferschen Versuche die Cholera-vibrionen bei Gegenwart von Immunsera besonders schnell in der Peritonealhöhle aufgelöst. Um zu sehen, ob die Konglutination des Rinderserums bei Gegenwart von Immunsensibilisatoren und Alexinen die Auflösung dieser Mikroben in vitro beschleunigen könnte, habe ich einige Versuche gemacht, welche jedoch nicht eine endgültige Antwort auf die aufgestellte Frage gegeben haben. Eine Konglutination tritt auch mit diesen Mikroben hervor, aber ob das inaktivierte Rinderserum auch die Bakteriolyse beschleunigt, kann ich nicht sicher behaupten, obwohl meine Versuche dafür zu sprechen schienen.

Lebendige Typhus- und Colibacillen geben eine Konglutationsreaktion. Wie verhalten sich nach dieser Hinsicht diese abgetöteten Bacillen?

Tube 1: 0,5 ccm leb. Typhusbacillen + 0,1 ccm Meerschweinchenalexin + 0,05 ccm Typhusimmunserum + 0,05 ccm Rinderserum.

Tube 2: 0,5 ccm leb. Typhusbacillen + 0,05 ccm Typhusimmunserum + 0,05 ccm Rinderserum.

Tube 3: 0,5 ccm gekochte Typhusbacillen + 0,1 ccm Meerschweinchenalexin + 0,05 ccm Typhusimmunserum + 0,05 ccm Rinderserum.

Tube 4: 0,5 ccm gekochte Typhusbacillen + 0,05 ccm Typhusimmunserum + 0,05 ccm Rinderserum.

Tube 5: 0,5 ccm leb. Colibacillen + 0,1 ccm Meerschweinchenalexin + 0,05 ccm Coliimmunserum + 0,05 ccm Rinderserum.

Tube 6: 0,5 ccm leb. Colibacillen + 0,05 ccm Coliimmunserum + 0,05 ccm Rinderserum.

Tube 7: 0,5 ccm gekochte Colibacillen + 0,1 ccm Meerschweinchenalexin + 0,05 ccm Coliimmunserum + 0,05 ccm Rinderserum.

Tube 8: 0,5 ccm gekochte Colibacillen + 0,05 ccm Coliimmunserum + 0,05 ccm Rinderserum.

Agglutination entstand in den Tuben 2, 4, 6, 8, Konglutination in den Tuben 1, 3, 5 und 7.

Die Agglutination in Tube 2 ist viel schwächer als die Konglutination in Tube 1. Die Agglutination in Tube 4 war schwächer als die in Tube 2 und ebenso die Konglutination in Tube 3 schwächer als die in Tube 1. Die stärkste Zusammenballung zeigt Tube 1; die Agglutination war überhaupt schwächer als die Konglutination.

Ähnlich verhielten sich die entsprechenden Tuben mit Colibacillen.

Aus diesem Versuche ist zu ersehen, daß die Konglutination auch bei den gekochten Mikroben benützt werden kann,

obwohl dieselben eine schwächere Reaktion geben als die lebenden. Doch ist die Reaktion auch hier sehr deutlich. Daß auch die gekochten Mikroben ebenfalls eine schwache Agglutination zeigen, haben ja schon frühere Forscher [Dreyer u. Jex-Blake¹⁾, Eisenberg²⁾ u. a.] gezeigt.

Ebensogut wie mit lebenden Typhusbacillen kann man den Versuch mit Typhusbacillen, welche mit Formalin (Dreyer) abgetötet worden sind, anstellen. Um eine einheitliche Kultur und immer vergleichbare Resultate zu erhalten, ist es deshalb vorteilhaft, die Typhusbacillenkultur mit Formalin 0,05 Proz. zu versetzen. Eine so behandelte Kultur läßt sich gut aufbewahren und kann zu Konglutationsversuchen verwendet werden. Ob diese mit Formalin behandelte und gekochte Kultur eine ebenso streng spezifische Konglutination gibt wie lebende Kulturen, habe ich nicht untersucht.

Noch mag erwähnt werden, daß ich auch bei allen anderen von mir benutzten Mikroben, Pseudodiphtheriebacillen und Staphylokokken unter geeigneten Bedingungen, d. h. bei Gegenwart von Sensibilisatoren und Alexinen, eine Konglutination durch Rinderkonglutinin gesehen habe.

Ein durch die von mir benutzten Diphtheriebacillen erschöpftes inaktiviertes Rinderserum verliert nicht sein Vermögen, Pseudodiphtheriebacillen in Gegenwart von Alexin zu konglutinieren. Doch muß bemerkt werden, daß der Pseudodiphtheriebacillus, welchen ich untersuchte, ohne Immunserum überhaupt nur eine schwache Konglutination gab. Die Tatsache, daß die Diphtheriebacillen wohl die entsprechenden Sensibilisatoren, nicht aber die der Pseudodiphtheriebacillen aus dem Rinder- serum binden, könnte vielleicht zur Differenzierung dieser 2 Mikroben benutzt werden.

Ich habe früher erwähnt, daß die Konglutination bei Gegenwart von Rinder-, Pferde-, Meerschweinchen- und Kaninchenalexin entsteht. Noch mag erwähnt werden, daß Menschenalexin³⁾ diese anderen Alexine in geeigneten Fällen ersetzen kann. Die verschiedenen Alexine wirken in den verschiedenen Kombinationen mit ziemlich verschiedener Stärke. Das Meerschweinchenalexin scheint am stärksten zu wirken. Wenn dieses Alexin benutzt worden ist, so tritt die Konglutination in der Regel bei Stillstehen der Tuben im Thermostaten ein. Das Kaninchenserum scheint das schwächste zu sein. Wenn dieses Alexin benutzt worden ist, so müssen die Tuben gewöhnlich geschüttelt werden, um Konglutination zu geben. So ist es z. B. der Fall, wenn man mit diesem Serum die Konglutination der Pertussismikroben untersuchen will. Eine vollständige Uebereinstimmung findet man in dieser Hinsicht bei den Blutkörperchen. Wenn man z. B. Meerschweinchenblutkörperchen mit Kaninchenalexin und inaktivem Rinder- serum mischt, so bekommt man eine sehr langsame Hämolyse, wenn die Tuben still gehalten werden, und die Gegenwart des Rinderserums beschleunigt nicht die Hämolyse, welche allmählich und ohne Zusammen- schüttelung eintritt, gleichviel ob Rinderserum da ist oder nicht. Bereitet man sich aber 4 Tuben, 2 mit, 2 andere ohne 0,3 ccm Rinder- serum, und versetzt alle 4 mit Kaninchenalexin und Meerschweinchenblut- körperchen z. B. in folgenden Proportionen: 0,05 ccm Blutkörperchen, 0,5 ccm physiologische Kochsalzlösung, 0,3 ccm Kaninchenalexin, und schüttelt man die ganze Zeit 2 Tuben, eine mit und eine ohne Rinder- serum,

1) Dreyer u. Jex-Blake, Memoirs de l'Academie de sciences de Danemark. VIII. T. I.

2) Eisenberg, Centralbl. f. Bakt. etc. 1906.

3) Ich habe nur einige vereinzelte Versuche mit Menschenalexin gemacht.

in leiser Bewegung, läßt aber die 2 anderen, von denen also auch die eine Rinder Serum enthält, die andere nicht, ruhig stehen, so wird man beobachten können, wie in derjenigen in Bewegung gehaltenen Tube, wo das inaktive Rinder Serum vorhanden war, die Blutkörperchen nicht nur schneller als die in der entsprechenden stillstehenden Tube, sondern auch schneller als die in den Tuben, wo kein Rinder Serum vorhanden war, hämolysiert werden. Hier tritt auch eine sehr starke Zusammenballung der Blutkörperchen ein, eine Konglutination, während die anderen Tuben gar keine Zusammenballung zeigten.

Für die Konglutination der Mikroben ist also eine leichte Bewegung¹⁾ oft wünschenswert, welche Tatsache ich besonders hervorheben möchte.

Schlußfolgerungen.

1) Durch $\frac{1}{2}$ Stunde dauerndes Erhitzen auf 56° C verliert das Rinder Serum sein Zusammenballungsvermögen gegenüber mehreren Mikroben: Tuberkelbacillen, Diphtheriebacillen, Pertussisbacillen; die Zusammenballung kommt aber wieder zum Vorschein, wenn man das bei dem Erhitzen inaktivierte Alexin durch ein anderes nicht agglutinierendes alexinhaltiges Serum von Meerschweinchen, Kaninchen, Pferd oder Menschen ersetzt.

2) Diese zusammenballende Eigenschaft des Rinder Serums verschwindet auch, wenn man mittels Aqua dest. das Alexin zerstört oder wenn man durch vorhergehenden Kontakt mit sensibilisierten Blutkörperchen, Ziegenblutkörperchen, das Alexin dem Rinder Serum entzieht, entsteht aber wieder beim Zufügen von frischem Alexin.

3) Diese Zusammenballung tritt trotz Gegenwart eines Alexins nicht hervor, wenn das inaktive Rinder Serum durch vorhergehenden Kontakt mit entsprechenden Mikroben seiner gegen die resp. Mikroben wirksamen Sensibilisatoren beraubt worden ist (Diphtheriebacillen, Tuberkelbacillen Typus bovinus, Pertussismikroben, Typhusbacillen), entsteht aber doch auch unter diesen Bedingungen, wenn die entfernten Rindersensibilisatoren durch entsprechende Immunsensibilisatoren (Pertussis, Typhus u. a.) ersetzt werden. In einigen Kombinationen können die entfernten Rindersensibilisatoren durch in dem als Alexinquelle benützten Serum existierende Normalsensibilisatoren ersetzt werden (B. coli, B. tuberculosis Typus humanus).

4) Diese Zusammenballung der Mikroben ist nicht mit der Agglutination zu verwechseln. Um dieselbe und die gewöhnliche Agglutination auseinanderzuhalten, schlage ich für diese spezielle Zusammenballung denselben Namen Konglutination vor, welchen Bordet und Streng für eine von Bordet und Gay gefundene analoge, von der Gegenwart des Alexins und der Sensibilisatoren abhängige Zusammenballung der Blutkörperchen durch inaktives Rinder Serum vorgeschlagen haben.

5) Die bei der Konglutination wirksamen Stoffe des Rinder Serums, welche ich Konglutinine nennen will,

1) Dineur u. a. refer. v. Bordet, Annales de l'Institut Pasteur, macht darauf aufmerksam, daß auch für die Konglutination eine leichte Bewegung von Nutzen ist.

können durch Dialyse von den Agglutininen getrennt werden.

6) Die Konglutination ist nicht so zu verstehen, daß die Mikroben durch Sensibilisierung und Alexinaufnahme eine erhöhte Empfindlichkeit gegen die gewöhnlichen Agglutinine bekommen hätten. Auf in solcher Weise vorbehandelte Mikroben wirken die durch Dialyse von den Konglutininen getrennten Agglutinine schwächer als auf nicht vorbehandelte, während die Alexinbindung eine Vorbedingung für die Wirkung der sonst unwirksamen Konglutinine ist. Ist das Alexin gebunden worden, so können relativ starke Agglutinine nicht noch so geringe Mengen von Konglutinin ersetzen.

7) Die Konglutinationsphänomene verlaufen nicht immer parallel mit den Agglutinationsphänomenen: Mikroben, welche durch Rinderserum stärker agglutiniert werden, werden oft schwächer konglutiniert, und umgekehrt.

8) Die Konglutination, für welche die Gegenwart von Sensibilisatoren eine Vorbedingung ist, ist wie die Bakteriolyse und die Agglutination **spezifisch** und kann wie diese zu diagnostischen Zwecken benützt werden.

9) Eine Serodiagnose mit Hilfe der Konglutination wird so gemacht, daß das zu untersuchende, bei 56° C inaktivierte Serum und Mikroben gemischt werden. Zu dieser Mischung wird ein beliebiges Alexin und inaktives Rinderserum zugefügt. Wenn das zu untersuchende Serum Sensibilisatoren gegenüber den benützten Mikroben enthält, entsteht eine Konglutination, sonst nicht. Bei einigen besonders saprophytischen Mikroben müssen bisweilen die in dem als Alexinquelle benützten Serum und die in inaktivem Rinderserum existierenden Normalsensibilisatoren durch vorhergehenden Kontakt mit entsprechenden Mikroben ausgeschaltet werden. Auch kann anstatt eines so vorbehandelten Rinderserums ein durch Dialyse seiner Agglutinine und Sensibilisatoren beraubtes, in physiologischer Kochsalzlösung aufgelöstes Präzipitat von Rinderserum verwendet werden.

10) Eine Austitrierung der verschiedenen Mikrobensensibilisierenden Werte eines Normal- und Immunserums ist in dieser Weise durch fallende Dosen **in vitro** oft möglich.

11) Die Konglutination scheint oft eine empfindlichere Reaktion als die Agglutination zu sein. So entstand z. B. in einem Versuche bei Verwendung von 0,0001 ccm Immunserum noch eine Konglutination, während dasselbe Immunserum nur bis 0,005 ccm eine Agglutination zeigte.

12) Für das Entstehen einer Konglutination scheint der Nährboden, auf dem die Mikroben gezüchtet sind, von Bedeutung zu sein (Pertussis).

13) Die Pathogenität der Mikroben scheint bei der Konglutination eine Rolle zu spielen. Die saprophytischen Mikroben geben nämlich schon bei Gegenwart von Normalsensibilisatoren eine Reaktion, die pathogenen und virulenten scheinen die Gegenwart von Immunsensibilisatoren zu fordern.

14) Alle von mir untersuchten Mikroben (*B. tuberculosis*, *B. diphtheriae* und *pseudodiphtheriae*, *B. typhi*, *B. coli*, *V. cholerae asiaticae*, *Staphylococcus pyogenes*

aureus) geben bei Gegenwart der drei Vorbedingungen, Alexin, Sensibilisator, Konglutinin, eine Konglutination.

15) Die bei der Agglutination auftretenden Hemmungserscheinungen scheinen bei der Konglutination nicht eine so große Rolle zu spielen wie bei der Agglutination.

16) Die Konglutinationsreaktion kann auch mit gekochten oder mittels Formalins abgetöteten Mikroben angestellt werden.

Dem Herrn Prof. Dr. J. Bordet, der mir in seinem Institute Platz gewährt hat und mir in meiner Arbeit mit wertvollen Ratschlägen beigestanden hat, möchte ich hier meinen besten Dank aussprechen.

Brüssel, Dezember 1908.

Nachdruck verboten.

Ueber eine in den tuberkulösen Lymphdrüsen vorhandene, Tuberkelbacillen tötende Substanz.

[Aus dem Institut „Oswaldo Cruz“ in Manguinhos, Rio de Janeiro
(Direktor: Dr. Oswaldo Gonçalves Cruz).]

Vorläufige Mitteilung.

Von Dr. A. Fontes, Assistenten am Institute.

Mit 2 Kurven.

Zur Untersuchung der Frage, ob sich in den tuberkulösen Lymphdrüsen eine Substanz befände, welche imstande wäre, den Bacillus morphologisch zu verändern, oder ihn zu vernichten, bewogen uns folgende Gründe:

- a) Mit der Ziehlischen Methode sind keine Tuberkelbacillen im Eiter tuberkulöser Geschwüre nachweisbar, während die Gramsche Methode nicht nur Bacillen, sondern auch Granulationen zur Anschauung bringt.
- b) Die Elektivität der Tuberkelbacillengranulationen der Gramschen Methode gegenüber, die von mir zuerst beobachtet und bereits früher beschrieben wurde.

Es wurden zunächst folgende Versuche in vitro angestellt:

Käsige Lymphdrüsen von je einem, mit menschlicher Tuberkulose infizierten, Meerschweinchen wurden zerrieben, in physiologischer Kochsalzlösung, die 10-proz. Glyzerin und 0,5-proz. Karbolsäure enthielt, aufgeschwemmt und darin beim ersten Versuche 48, beim zweiten 72 Stunden lang mazeriert. Die beiden Emulsionen wurden dann gesondert durch Watte filtriert, und die Filtrate zu den Versuchen verwendet. Als Kontrolle wurden einerseits Lymphdrüsen normaler Meerschweinchen verwendet, die in durchaus gleicher Weise behandelt worden waren, und andererseits eine Tuberkelbacillenaufschwemmung, welche aus einer in Glyzerinkochsalzlösung getauchten Kartoffelkultur gewonnen war. Die Zählungen wurden mit Okular 12 Zeiss vorgenommen, und zwar bei Präparaten, die nach der früher von mir angegebenen Methode gefärbt worden waren, wobei jedoch absoluter Alkohol als Entfärbungsmittel diente.

Es sei besonders darauf hingewiesen, daß sowohl Versuchs- wie Kontrollpräparate immer auf demselben Objektträger bereitet wurden, so daß beide Teile stets genau dieselben Phasen des Färbeprozesses durchmachten.

In den nachstehenden Kurven sind folgende Abkürzungen zu berücksichtigen:

- e.t.l.d. = Extrakt aus tuberkulösen Lymphdrüsen.
- e.n.l.d. = Extrakt aus normalen Lymphdrüsen.
- t.b.e. = Tuberkelbacillenemulsion.
- v. = Vehikel (physiologische Kochsalzlösung, enthaltend 10-proz. Glycerin und 0,5-proz. Karbolsäure).

Der Gang der angewandten Färb- bzw. Entfärbungsmethode sei hier nochmals kurz erwähnt:

- A. Behandlung mit Ziehlscher Lösung in der Wärme.
- B. Waschen in Leitungswasser.
- C. Behandlung nach Gram unter Benutzung von Acetonalkohol als Entfärbungsmittel.

Aus Kurve I ersehen wir, daß sich die Wirkung der betreffenden Substanz bis auf die Dauer von 120 Stunden erstreckte. Der kleine Zuwachs, den man auf Kurve II kurz vor der 120. Stunde beobachtet, beruht wahrscheinlich auf der Zerkrümelung einiger Bacillenhäufchen.

Es wurde fernerhin versucht, diese Substanz zu reaktivieren, und zwar durch Zusatz einer größeren Menge e.t.l.d. (= A), sowie durch Hinzufügen von frischem Blutserum eines gesunden Meer-schweinchens (= B).

A. Dem Röhrchen, welches 1 ccm t.b.e. + 1 ccm e.n.l.d. enthielt, wurde 1 ccm e.n.l.d. zugesetzt (Röhrchen a); demjenigen, welches 1 ccm t.b.e. + 1 ccm e.t.l.d. enthielt, wurde 1 ccm e.t.l.d. zugesetzt (Röhrchen b).

Im Durchschnitt wurden nach 24-stündigem Kontakt bei 38° C erhalten:

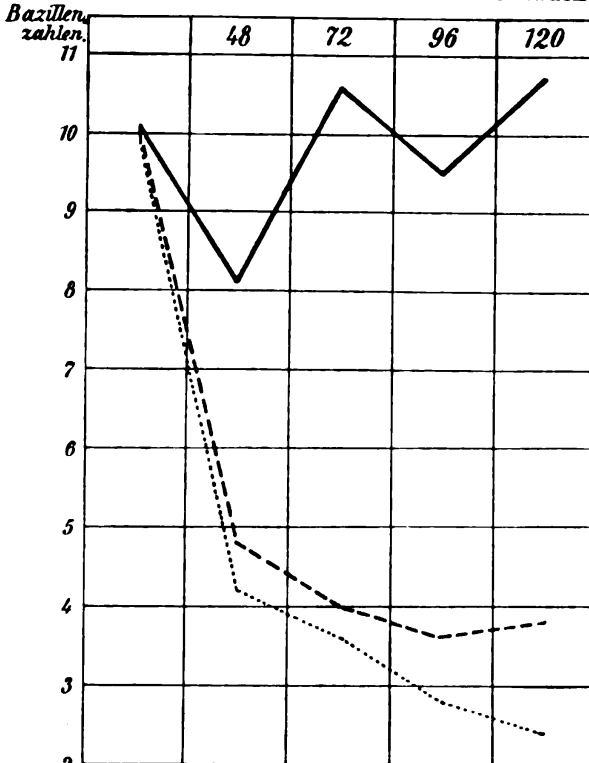
Röhrchen a 23,4
Röhrchen b 13,85

Das Verhältnis zwischen den Zählungen vor und nach dem Zusatze von e.t.l.d.

$$\frac{\text{n.l.d.e.}}{\text{e.t.l.d.}} = \frac{31,1}{17,9} = 1,73$$

$$\frac{\text{e.t.l.d.}}{\text{e.t.l.d.}} = \frac{23,4}{13,8} = 1,69$$

Fig. 1.
Durchschnittszahlen nach Kontakt von Stunden:

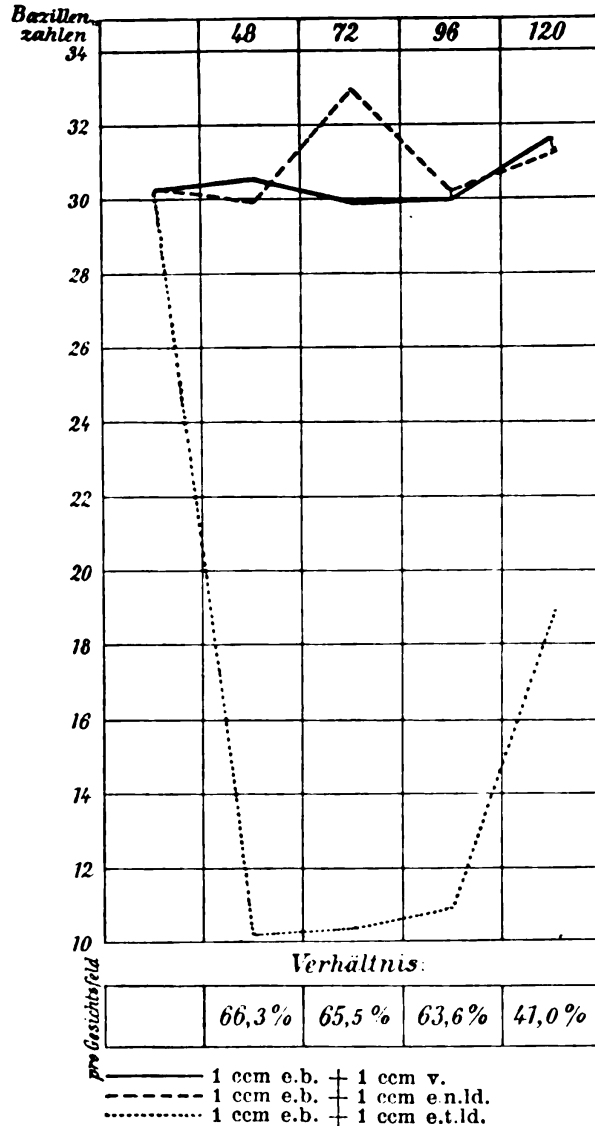


Verhältnis:				
-----	41,0 %	62,2 %	61,4 %	64,8 %
.....	48,2 %	60,5 %	69,6 %	78,7 %

— 1 ccm e.b. + 1 ccm v.
- - - 1 ccm e.b. + 0,5 ccm e.t.l.d. + 0,5 v.
..... 1 ccm e.b. + 1 ccm e.t.l.d.

B. Zu 0,75 ccm des Röhrchens a wurden 0,05 ccm physiologischer Kochsalzlösung + 1 ccm frischen Blutserum eines gesunden Meerschweinchens zugesetzt (Röhrchen a').

Fig. 2.
Durchschnittszahlen nach Kontakt von Stunden:



4) Sie wird durch den Zusatz einer größeren Menge e.t.ld. nicht reaktiviert.

5) Sie wird ebensowenig durch frisches Blutserum eines gesunden Meerschweinchens reaktiviert.

Zu 0,75 ccm des Röhrchens b wurden 0,05 ccm physiologischer Kochsalzlösung + 1 ccm frischen Blutserums eines gesunden Meerschweinchens zugesetzt (Röhrchen b').

Durchschnittliche Resultate 48 Stunden nach Beginn der Einwirkung des Blutserums:

Röhrchen a' = 10,9

Röhrchen b' = 6,2

Vor und nach der Einwirkung des Serums erzielte Verhältnisse:

Vor: $\frac{23,4}{13,8} = 1,73$ (Verhältnis zwischen a und b)

Nach: $\frac{10,9}{6,2} = 1,79$ (Verhältnis zwischen a' und b').

Schlußfolgerungen.

1) In den tuberkulösen Lymphdrüsen von Meerschweinchen befindet sich eine Substanz, welche die Fähigkeit besitzt, in vitro die Zahl der Tuberkelbacillen herabzusetzen.

2) Diese Substanz kommt in den Lymphdrüsen des gesunden Meerschweinchens nicht vor.

3) Die größte Wirkung entfaltet sie bis zu der 120. Stunde, vom Beginn des Kontaktes an gerechnet.

Nachdruck verboten.

Ueber den Einfluss der Agglutination auf die kulturellen, agglutinierenden und bakteriolytischen Eigenschaften des Typhusbacillus.

[R. Istituto di studi superiori e di perfezionamento in Firenze.]
[Aus dem Laboratorium für pathologische Anatomie. Direktor Prof. Guido Banti.]

Von Dr. Giulio Crescenzi, Assistenten.

Die Versuche auf dem Gebiete der Immunität haben in den letzten Jahren eine unendliche Reihe von Forschern beschäftigt, und es wäre in der Tat eine schwere Aufgabe für mich, den aktuellen Zustand der verschiedenen Fragen dieses Arguments in Synthesen zusammenzufassen, noch würde der Lohn der unendlichen Arbeit entsprechen.

Der Studierende findet in dem Meisterwerke von Kolle und Wassermann und in dem von Levaditi mit Klarheit und Treue einen Auszug aller interessanten Probleme dieses großen und reichen Feldes, sowohl hinsichtlich der Theorie als auch der Praxis.

Es ist eine bekannte Tatsache in der Immunität, daß die Bakteriolysen und die Agglutination zwei verschiedene spezifische Erscheinungen sind, so wie die Bakteriolysen (Ehrlich, Bordet, Metschnikoff usw.) der Wirkung einer thermolabilen Substanz zuzuschreiben ist, welche einen normalen Komponenten des Blutes aller Tiere bildet (Komplement von Ehrlich, Alexine von Buchner, Cytase von Metschnikoff), und bei 55° zerstört wird; und von einer thermostabilen Substanz (Ambozeptoren oder immunisierende Körper oder Zwischenkörper von Ehrlich, Fixator von Metschnikoff, sensibilisierende Substanzen von Bordet), die bei einer Temperatur von 60–65° nicht zerstört wird. Auch ist es wohl bekannt, daß die Agglutinine der Erwärmung bis zu 70° und darüber widerstehen, und daß endlich die Bildung der Agglutinine und der Bakteriolysine zwei Erscheinungen sind, welche eine von der anderen unabhängig sein können, wie die Arbeiten von Brieger und Schütze sehr klar beweisen.

In der Absicht, festzustellen, ob und unter welchen Verhältnissen die agglutinierenden Mikroorganismen einige ihrer biologischen Eigenschaften oder einige ihrer Anlagen in der Produktion der Immunitätsreaktion verändern, habe ich eine Reihe von Versuchen unternommen, welche ich hier kurz zusammenfassen will.

Zu diesen Versuchen bediente ich mich eines Typhusstammes, welcher kürzlich aus der Leiche isoliert war. Mit wiederholten Injektionen steigender Dosen lebender Mikroorganismen in das Peritoneum der Kaninchen erhielt ich ein Serum von hohem agglutinierendem Werte (1:10 000).

Um zu bestimmen, wie dieser agglutinierende und in der Folge zu wiederholten Malen auf Nährböden gesäete Mikroorganismus sich hinsichtlich seiner Charaktere gegenüber dem Kontrollmikroorganismus verhielt, machte ich den Stamm so virulent, daß eine normale Oese in 24 Stunden ein Meerschweinchen von 250 g Gewicht tötete. In 2 sterilen Röhrchen, deren jedes 5 ccm physiologischer Kochsalzlösung enthielt, machte ich eine Verdünnung von einer Oese pro Röhrchen des virulent

gemachten Stammes und fügte dann dem einen Röhrchen einen Tropfen normalen Kaninchenserums hinzu, dem anderen einen Tropfen agglutinierenden Serums und brachte sie in den Brutschrank.

Nach 2 Stunden machte ich aus jedem Röhrchen Impfungen auf Schrägagar, indem ich eine Oese der Emulsion darüber strich und dann von dem Kondensationswasser weiter auf Schrägagar impfte. Die so bereiteten Kulturen, sowohl jene von den agglutinierten Mikroorganismen, als auch jene aus den Kontrollröhrchen, im Brutschrank bei 37° gehalten, entwickelten sich nach derselben Zeit, mit denselben Eigenschaften und in fast gleicher Menge. Einen Tag um den andern machte ich aus dem Röhrchen, welches mit agglutinierten Mikroorganismen besät war, neue Verdünnungen in physiologischer Kochsalzlösung, neue Agglutinations- und neue Inokulationsversuche, wie auch identische Verdünnungen mit Zusatz von normalem Serum. Weitere Impfungen machte ich aus dem Kontrollröhrchen, und zwar immer mit denselben oben genannten Erfolgen betreffs ihrer Entwicklung.

Diese Versuche wurden einen Monat fortgesetzt und die Agglutinationsgrenze wurde mit demselben Serum in den einzelnen Passagen studiert. Sowohl mit den nach der Agglutination kultivierten Mikroorganismen, als auch mit den Kontrollmikroorganismen erreichte ich immer den primitiven Wert von 1 : 10 000.

Um das Verhalten der Virulenz der so behandelten Mikroorganismen zu bestimmen, injizierte ich ins Peritoneum der Meerschweinchen eine 24 Stunden nach jeder Agglutination bereitete Kulturöse und gleichzeitig andere mit derselben Menge der Kulturen des entsprechenden Kontrollröhrchens.

In folgender Tabelle fasse ich die Resultate dieser ersten Versuchsserie zusammen:

Injektion ins Peritoneum eines Meerschweinchens

von 300 g	mit einer Kulturöse nach der 1. Agglutination; das Meerschweinchen stirbt nicht in 24 Stunden,
„ 300 g	mit einer Kulturöse aus dem entsprechenden Kontrollröhrchen; das Meerschweinchen stirbt nicht in 24 Stunden,
„ 285 g	mit einer Kulturöse nach der 2. Agglutination; das Meerschweinchen stirbt in 24 Stunden,
„ 285 g	mit einer Kulturöse aus dem Kontrollröhrchen; das Meerschweinchen stirbt nicht in 24 Stunden,
„ 250 g	mit einer Kulturöse nach der 3. Agglutination; das Meerschweinchen stirbt in 24 Stunden,
„ 250 g	mit einer Kulturöse aus dem Kontrollröhrchen; das Meerschweinchen stirbt in 24 Stunden,
„ 300 g	mit einer Kulturöse nach der 4. Agglutination; das Meerschweinchen stirbt nicht in 24 Stunden,
„ 300 g	mit einer Kulturöse aus dem Kontrollröhrchen; das Meerschweinchen stirbt nicht in 24 Stunden,
„ 285 g	mit einer Kulturöse nach der 7. Agglutination; das Meerschweinchen stirbt in 24 Stunden,
„ 285 g	mit einer Kulturöse aus dem Kontrollröhrchen; das Meerschweinchen stirbt in 24 Stunden,
„ 250 g	mit einer Kulturöse nach der 9. Agglutination; das Meerschweinchen stirbt in 24 Stunden,
„ 250 g	mit einer Kulturöse aus dem Kontrollröhrchen; das Meerschweinchen stirbt in 24 Stunden,
„ 280 g	mit einer Kulturöse nach der 10. Agglutination; das Meerschweinchen stirbt in 36 Stunden,
„ 280 g	mit einer Kulturöse aus den Kontrollröhrchen; das Meerschweinchen stirbt in 36 Stunden,

- von 250 g mit einer Kulturöse nach der 12. Agglutination; das Meerschweinchen stirbt nicht,
 „ 250 g mit einer Kulturöse aus dem Kontrollröhrchen; das Meerschweinchen stirbt nicht.

Ich konnte keine Versuche mit weiteren Passagen machen, da auch die Mikroorganismen der Kontrollröhrchen an Virulenz verloren hatten, und so konnte ich sie folglich nicht mehr auf andere Meerschweinchen übertragen, um sie auf den primitiven Virulenzgrad zurückzubringen, ohne den Begriff, der mich in dieser Versuchsserie geleitet hatte, zu verändern.

Die Kulturen, welche stets aus dem Peritoneum und aus dem Herzblut des Tieres bei der Obduktion gemacht wurden, ergaben eine Entwicklung reichlicher Kolonien von Typhusbacillen in reiner Kultur.

In einer zweiten Versuchsserie wollte ich bestimmen, ob und in welchem Grade eine Injektion von agglutinierten Mikroorganismen im Meerschweinchen die Bildung von Agglutininen erzeugen könnte.

Ich injizierte 8mal ins Peritoneum von 4 Meerschweinchen, indem ich zwischen einer und der anderen Injektion so viel Zeit verstreichen ließ, bis die Tiere ihr primitives Gewicht wieder erreicht hatten, eine Kulturöse von Typhusbacillen, welche in 2 ccm physiologischer Kochsalzlösung emulsiert waren, mit Zusatz eines Tropfens Kaninchenserums, welches 1:10000 agglutinierte und 2 Stunden im Brutschrank gehalten wurde. Gleichzeitig injizierte ich 2 Kontrollkaninchen dieselbe Menge von Kultur mit Zusatz eines Tropfens normalen Kaninchenserums und dann auch 2 Stunden im Brutschrank gehalten. Natürlich hatten, während in einem Röhrchen die Mikroorganismen vollständig agglutiniert waren, sie im anderen keine Veränderung erlitten.

Die ersten Meerschweinchen hatten durch die schnelle Bakteriolyse, welche dem Zusatz eines Serums immunisierter Tiere zuzuschreiben war, eine geringe Wirkung von der Injektion, während die Kontrolltiere sogleich stark an Gewicht abnahmen und erst nach mehreren Tagen eine neue Injektion zuließen. Die 8 Injektionen wurden in Zeit von 2 Monaten sowohl den Versuchs- als auch den Kontrollmeerschweinchen gemacht, und das Blut wurde durch Herzstich 9 Tage nach der letzten Injektion entnommen.

Der von den 2 Kontrollmeerschweinchen erhaltene agglutinierende Wert war resp. 1:1000 und 1:1200, der von den anderen 4 Meerschweinchen, die mit agglutinierten Bacillen injiziert waren, schwankte von einem Minimum von 1:400 bis zu einem Maximum von 1:700.

Im Gegensatz zur Behauptung von Rehns, Nicolle und Trenel entfernen sich meine Resultate also nicht von denen von Neisser und Lubowsky, welche diese Frage zum Gegenstand einer ihrer sehr sorgfältigen und vollkommenen Arbeiten machten, und auch ich bin der Meinung, daß diese Erscheinung durch die Hypothese zu erklären sei, daß in diesen Fällen die Rezeptoren der Typhusbacillen sozusagen von den Agglutininen gesättigt sind, und sich nicht mehr mit den entsprechenden Rezeptoren der Zellen verbinden können, um ihre Hyperproduktion, ihre Trennung von den Zellen und ihr sich ins Blutergießen hervorzubringen, wo sie die Agglutinine bilden. In einigen Fällen muß aber zugegeben werden, daß die Tiere die Fähigkeiten besitzen, die Agglutinine, wenigstens teilweise, von den bakteriischen Rezeptoren zu trennen, mit denen sie in vitro fixiert sind, und die Rezeptoren, welche auf diese Art wieder frei und aktiv geworden sind, können die Produktion der Agglutinine erzeugen.

Um nun die Virulenz der agglutinierten Bacillen zu bestimmen, welche ins Peritoneum der Meerschweinchen injiziert worden waren, zum Vergleich der Virulenz der nicht agglutinierten Bacillen, suchte ich den Titer des bakteriolytischen Vermögens des Kaninchenserums, welches ich zur Agglutination benutzte, durch Versuche zu bestimmen. Zu diesem Zwecke hatte ich mich durch präliminare Versuche überzeugt, und zwar sowohl durch Injektionen der Meerschweinchen ins Peritoneum mit einer gewissen Menge von Mikroorganismen, welche in einer Verdünnung von 1:100 und 1:500 von agglutinierendem Serum emulsioniert waren, und nachdem ich dasselbe entkomplementiert hatte, indem ich es eine halbe Stunde bei 55° hielt, als auch durch Injektion derselben Verdünnung desselben nicht entkomplementierten Serums. Ich erhielt dabei identische Resultate, d. h. die Bakteriolyse bildete sich schnell und die Tiere starben nicht, während die Kontrolltiere mit Injektion von Mikroorganismen und mit Zusatz eines Tropfens normalen Kaninchenserums in 24 Stunden zugrunde gingen, als ich die Verdünnungsgrenze des Serums finden wollte, welche noch starke agglutinierende Eigenschaften aufweist, während die bakteriolytischen verschwinden, oder zu einer zu übersehenden Quantität reduziert werden.

Ich benutzte dasselbe Serum, welches dem Kaninchen vor 3 Monaten entnommen und gut aufbewahrt worden war, so daß es noch im Verhältnis von 1:10000 agglutinierte.

In folgender Tabelle unterbreite ich die Versuche:

Meerschweinchen	Gewicht g	Injekt. einer Kulturöse von Bacillen in 2 ccm phys. NaCl-Lösung mit Zus. aggl. Serum im Verhältnis
1—A	225	1:1000
2—B	235	1:1000
3—A	235	1:1500
4—B	235	1:1500
5—A	225	1:2000
6—B	225	1:2000
7—A	240	1:3000
8—B	240	1:4000
9—A	230	1:6000
10—B	240	1:6000

In den mit A bezeichneten Meerschweinchen wurde das Serum zur Mikroorganismenemulsion in den verschiedenen Verhältnissen hinzugefügt, dann wurde die Mischung 2 Stunden im Brutschrank aufbewahrt (deutliche Agglutination).

Den mit B bezeichneten Meerschweinchen wurde das Serum in demselben Verhältnis hinzugefügt, nachdem die Kultur schon 2 Stunden im Brutschrank gewesen war, d. h. im Momente der Injektion.

Die beiden ersten Meerschweinchen starben nicht, während die anderen 8 in den folgenden 24 Stunden nach der Injektion starben. Die agglutinierten Mikroorganismen haben also einen gleichen Virulenzgrad, wie die nicht agglutinierten, wenn in der Verdünnung des Serums die Gegenwart der Bakteriolyse in solcher Menge ausgeschlossen werden kann, daß sie dem injizierten Tiere besondere Anlage zur Immunität gibt.

Aber bei der Prüfung der Peritonealflüssigkeit, welche jede halbe Stunde nach der Injektion entnommen wurde, beobachtete ich eine gewisse Zahl von unbeweglichen und zerstückelten Bacillen, ein Beweis, daß die Bakteriolyse auch bei einer Verdünnung von 1:6000 immer

noch zugegen waren, wenn auch nicht in solcher Menge, um das Tier vor dem Tode zu bewahren.

Dem Zwecke meiner Versuche entsprechend, versuchte ich, die Bakteriolyse von den Agglutininen zu trennen, und auch um die überschüssigen Agglutinine zu entfernen, wusch ich in physiologischer Kochsalzlösung und zentrifugierte zu wiederholten Malen die agglutinierten Bacillen. Nachdem ich sie wieder in physiologischer Kochsalzlösung emulsiert hatte, injizierte ich sie den Meerschweinchen; gleichzeitig injizierte ich anderen Meerschweinchen dieselbe Menge von Mikroorganismen mit und ohne Zusatz normalen Kaninchenserums, welche Mikroorganismen, ebenso wie die anderen, wiederholten Waschungen und Zentrifugationen unterworfen wurden.

No. 1. Zwei Meerschweinchen, Gewicht 250 g, werden ins Peritoneum injiziert, jedes mit einer Mikroorganismenöse. Die Mikroorganismen waren in physiologischer Kochsalzlösung emulsiert, nachdem sie 2 Stunden im Brutschrank verblieben, 5mal 10 Min. lang zentrifugiert worden und dann wieder in physiologischer Kochsalzlösung emulsiert. Die Meerschweinchen starben in 24 Stunden.

No. 2. Zwei Meerschweinchen, Gewicht 200 g, werden ins Peritoneum injiziert, jedes mit einer Oese von Mikroorganismen, welche in physiologischer Kochsalzlösung emulsiert und mit einem Tropfen normalen Kaninchenblutserums versetzt war, nachdem sie 2 Stunden im Brutschrank gewesen und wie oben beschrieben behandelt worden waren. Die Meerschweinchen starben in 24 Stunden.

No. 3. Sechs Meerschweinchen, Gewicht 210—250 g, werden ins Peritoneum injiziert, jedes mit einer Mikroorganismenöse, welche in physiologischer Kochsalzlösung emulsiert und mit einem Tropfen agglutinierendem Serum versetzt ist, nach 2-stündigem Verblieben im Brutschrank (vollständige Agglutination), wie beschrieben behandelt. Nur 2 der injizierten Meerschweinchen starben. In allen Fällen sah man in den Präparaten im hängenden Tropfen, die 1 Stunde nach der Injektion bereit waren, eine deutliche Bakteriolyse.

No. 4. Zwei Meerschweinchen, Gewicht 230 g, werden ins Peritoneum injiziert mit einer reichlichen Mikroorganismenöse, und wie in No. 3 behandelt. Die 2 Meerschweinchen starben nicht. Deutliche Bakteriolyse in den eine Stunde nach der Injektion bereiteten Präparaten im hängenden Tropfen.

Wie aus der Prüfung der Präparate, welche aus der Peritonealflüssigkeit bereit sind, hervorgeht, und auch durch das Ueberleben der Meerschweinchen bestätigt wird, war es in diesen Versuchen nicht gelungen, die Bakteriolyse von den Agglutininen vollständig zu trennen, und deshalb habe ich dieselben Versuche wiederholt, indem ich Bacillenemulsionen anwandte, in welchen das Serum in geringerer Konzentration war (1:1000—1:2000), und indem ich gleichzeitig die Zahl der Waschungen der Mikroorganismen vermehrte.

Auf diese Weise gelang es mir, in derselben Zeit sowohl die beiden, mit agglutinierendem Serum im Verhältnis von 1:1000 und die beiden 1:2000 injizierten Tiere, als auch das Kontrolltier zu töten. Ich muß aber bemerken, daß, obgleich diese 5 Tiere dasselbe Gewicht hatten (250 g), wie die vorher benutzten, und die Virulenz des Mikroorganismus in der Dosis von einer Oese für jedes Tier dieser Größe tödlich war, ich in diesen letzten Versuchen etwas mehr Material als eine Kulturöse verbraucht habe, da beim Wechseln des Waschwassers immer eine gewisse Menge der Mikroorganismen verloren geht. In der Tat starben in anderen, früher gemachten Versuchen, in welchen die angewandte Quantität genau eine normale Oese war, weder die mit agglutinierendem Serum injizierten Tiere, noch die Kontrolltiere.

Aus dem Vergleich der Resultate dieser beiden Versuchsgruppen konnte ich die Hypothese noch mehr bekräftigen, daß, um den Tod der Meerschweinchen zu verhindern, es nicht von Wichtigkeit ist, daß die Mikroorganismen agglutiniert seien, denn sowohl in der ersten, als auch

in der zweiten Versuchsgruppe war die Agglutination total. Aber wenn die Bakteriolyse in bedeutender Menge zugegen waren (in der ersten Gruppe fügte ich Serum im Verhältnis von 1:50 hinzu), so konnte man sie sogar mit wiederholten Waschungen nicht ganz entfernen.

Um den Einfluß der Bakteriolyse in meinen Versuchen ausschließen zu können, habe ich versucht, solche Sera anzuwenden, welche, wenn sie auch ein geringes agglutinierendes Vermögen haben, kein, oder wenigstens ein sehr kleines bakteriolytisches Vermögen besitzen.

Zu diesem Zwecke benutzte ich das Blutserum eines Typhuskranken vom 7. Tage der Krankheit, welches Serum ein agglutinierendes Vermögen von 1:100 besaß, und nachdem ich in präliminären Versuchen beobachtet hatte, daß es keine bakteriolytischen Eigenschaften besaß, auch wenn es in einer Menge von 2 Tropfen in das Peritoneum eines Meerschweinchens injiziert wurde, welches gleichzeitig eine Kulturöse erhalten hatte.

Hier folgen die Versuche dieser Gruppe:

No. 1. Einem Meerschweinchen von 250 g Gewicht injizierte ich ins Peritoneum eine virulente Kulturöse, welche in 2 ccm physiologischer Kochsalzlösung emulsiert und 2 Stunden im Thermostaten gehalten war.

No. 2. Einem Meerschweinchen von 225 g Gewicht injizierte ich in das Peritoneum eine virulente Kulturöse in 2 ccm physiologischer Kochsalzlösung emulsiert mit Zusatz eines Tropfens Blutserums von einem gesunden Individuum und 2 Stunden im Thermostaten gehalten.

No. 3. Zwei Meerschweinchen von 250 g Gewicht injizierte ich ins Peritoneum eine virulente Kulturöse, die in 2 ccm physiologischer Kochsalzlösung emulsiert und dann 2 Stunden im Brutschrank gehalten war, darauf im Verhältnis von 1:100 mit dem Serum des genannten Kranken versetzt wurde.

No. 4. Zwei Meerschweinchen von 240 g Gewicht injizierte ich ins Peritoneum eine virulente Kulturöse, welche in 2 ccm physiologischer Kochsalzlösung emulsiert war, mit Zusatz des Serums vom genannten Kranken im Verhältnis von 1:100 und dann 2 Stunden im Brutschrank gehalten. Deutliche Agglutination.

In den folgenden 24 Stunden starben alle Tiere, sowohl die Versuchs- als auch die Kontrolltiere.

In einer anderen Versuchsgruppe brauchte ich Blutserum von Kaninchen, welche mit Typhusbacillenextrakt injiziert waren, da dieses Serum ein minimales bakteriolytisches Vermögen besaß und ein agglutinierendes Vermögen von 1:1000.

Ich wiederholte genau die oben beschriebenen Versuche (indem ich das Serum bei maximaler Agglutinationsgrenze anwandte) an Meerschweinchen verschiedenen Gewichtes von 220—250 g. In den folgenden 24 Stunden starb eins der Kontrollmeerschweinchen, die zwei, bei denen ich das Serum im Moment der Injektion zusetzte, und eins von denen, welchen agglutinierte Bacillen injiziert worden waren.

Nachdem ich mich durch Injektion in andere Kontrolltiere versichert hatte, daß diese Nichtübereinstimmung der Resultate der verminderten Virulenz des Mikroorganismus zuzuschreiben war, ließ ich die Virulenz desselben auf eine Oese wieder erlangen und wiederholte den Versuch, und diesmal starben alle injizierten Tiere.

Zu identischen Resultaten gelangte ich durch ein agglutinierendes Serum 1:200, welches in bakteriolytischer Hinsicht übersehen werden konnte, und durch subkutane Injektion von Typhusbacillen in Kaninchen erhalten war, welche Bacillen getötet waren, nachdem sie auf Rat von Kasten $\frac{1}{2}$ Stunde bei 65° gehalten wurden.

Endlich wiederholte ich diese Versuche, indem ich das Serum eines jungen Hundes benutzte, welcher 10 Tage lang mit einer reichlichen Quantität von Bouillon- und Agarkulturen von Typhusbacillen gefüttert

wurde, wie Fränkel und Otto raten, zur Erreichung eines agglutinierenden Serums ohne bakteriolytische Eigenschaften.

Obgleich der agglutinierende Titer des Serums nur bis zu 1:40 gestiegen war, injizierte ich dennoch eine Serie von Meerschweinchen, wie in den vorhergehenden Versuchen, und auch in diesem Falle starben alle injizierten Tiere im Laufe von 24 Stunden, und die bei der Nekroskopie gemachten Kulturen entwickelten, wie immer, reichliche Kolonien von Typhusbacillen in reiner Kultur.

Aus diesen meinen Versuchen glaube ich folgende Schlüsse ziehen zu können:

1) Die Agglutination in Serien des Typhusbacillus bringt keine fühlbaren Modifikationen in dessen kulturellem Charakter hervor, weder in seiner Vitalität, noch in seiner Agglutination oder Virulenz gegenüber dem Kontrollstamm, welcher dieselbe Zahl einfacher Impfungen erleidet.

2) Die Injektion agglutinierter Typhusbacillen in Tiere ruft in dem Serum dieser Tiere geringere agglutinierende Eigenschaften hervor, als die, welche durch identische Injektionen mit nicht agglutinierten Mikroorganismen in den Kontrolltieren hervorgerufen wurden.

3) Wenn die Mitwirkung des bakteriolytischen Vermögens ausgeschlossen werden kann, so ist die Virulenz der Typhusbacillen bei Injektionen in Tieren nicht dadurch beeinflusst, daß der Mikroorganismus agglutiniert ist oder nicht.

Literatur.

- Fraenkel u. Otto, Münch. med. Wochenschr. 1897. No. 39.
 Behne, Compt. rend. de la Soc. de Biol. 1900. p. 1058.
 Nicolle et Trenel, Compt. rend. de la Soc. de Biol. 1900. p. 1088.
 Brieger, Deutsche med. Wochenschr. 1902. No. 27.
 Schütze, Deutsche med. Wochenschr. 1902. No. 27.
 Kasten, Deutsche med. Wochenschr. 1903. p. 637.
 Neisser u. Lubowski, Gesammelte Arbeiten zur Immunitätsforschung. Herausgeg. von Ehrlich. Berlin 1904.
 Kelle u. Wassermann, Handbuch der pathogenen Mikroorganismen. Jena 1904.
 Kraus u. Levaditi, Handbuch der Technik und Methodik der Immunitätsforschung. Jena 1907.

Nachdruck verboten.

Ueber die Beziehungen des Antitoxingehaltes des Diphtherieserums zu seinem Heilwert.

Aus dem Kgl. Institut für experimentelle Therapie zu Frankfurt a. M.
(Direktor: Geh. Obermedizinalrat Prof. Dr. P. Ehrlich).]

III. Mitteilung¹⁾.

Von Stabsarzt Dr. W. Berghaus, Mitglied des Instituts.

In 2 früheren Mitteilungen haben wir unter Darlegung der Protokolle ausführlich über Heilversuche an Meerschweinchen berichtet. Auf Grund der völlig gleichmäßigen Resultate, die wir durch die systematische Untersuchung 18 hoch- und niederwertiger Sera verschiedenster Her-

1) Vergl. diese Zeitschr. Bd. XLVIII. p. 450 und Bd. XLIX. p. 281.

kunft gewonnen hatten, hielten wir uns zu dem allgemein gültigen Schluß berechtigt, daß die Heilwirkung eines Serums einzig und allein von seinem Gehalt an Antitoxineinheiten abhängig sei.

In unserer Beweisführung war jedoch trotz des umfangreichen Tatsachenmaterials, das wir beibringen konnten, noch eine nicht unwesentliche Lücke bestehen geblieben, die immerhin wieder Veranlassung zu weiteren Einwänden hätte geben können, und zwar fehlten uns in der Reihe der untersuchten Sera gerade diejenigen, welche nach den Angaben von Kraus und Schwoner das differente Verhalten im Heilversuch gezeigt und dadurch die genannten Autoren zu der Annahme veranlaßt hatten, daß neben dem Antitoxingehalt auch noch die Avidität des Serums für die Heilwirkung maßgebend sein müsse. Die Möglichkeit, daß zwischen den Krausschen Seris und den unserigen ein Unterschied vorhanden sei, blieb bestehen und konnte a priori ohne eine genaue Untersuchung nicht in Abrede gestellt werden. Wir haben derselben auch von vornherein Rechnung getragen, indem wir bereits in unserer I. Mitteilung auf die Notwendigkeit einer Nachprüfung mittels der Originalpräparate hingewiesen haben.

Dank dem lebenswürdigen Entgegenkommen des Herrn Prof. R. Kraus, welcher uns inzwischen eine größere Anzahl seiner Sera, insgesamt 13, übersandte, war uns nun die Gelegenheit geboten, auch diese Prüfung vorzunehmen und damit die Kette unserer Beweise zu schließen. Im folgenden soll nun über diese sowie über einige an Kaninchen ausgeführte Heilversuche berichtet werden.

Außerdem aber hatten wir uns noch in einer weiteren Reihe von Versuchen die Aufgabe gestellt, den Grund für das von den beiden Autoren beobachtete differente Verhalten einzelner Sera zu ermitteln. Zu diesem Zweck suchten wir den Heilwert eines Serums festzustellen, indem wir es abweichend von unseren früheren Versuchen, aber entsprechend dem Vorgang von Kraus subkutan injizierten, nachdem wir vorher eine gleichmäßige Vergiftung auf intrakardialen Wege herbeigeführt hatten; damit hofften wir einen Einblick in die Resorptionsverhältnisse des Subkutangewebes zu bekommen.

I. Heilversuche an Meerschweinchen mit den von Kraus übersandten Seris mittels intrakardialer Injektion von Gift und Serum.

Von den übersandten 13 Seris haben wir, ohne eine Auswahl zu treffen, 8 einer Nachprüfung unterzogen. Von der Prüfung der übrigen nahmen wir Abstand, als die Versuche mit den ersteren einen absolut eindeutigen Verlauf nahmen, und zwar, wie vorweggenommen sein mag, konform mit unseren früheren, d. h. völlig im Sinne der Anschauung Ehrlichs. Aus demselben Grunde begnügten wir uns auch, wie wir weiter unten sehen werden, die Heilwirkung nur in einer Versuchsanordnung, und zwar bei einem Intervall von $1\frac{1}{2}$ Stunde zwischen Gift- und Seruminjektion festzustellen. Dieser Zeitintervall erschien, wie von uns bereits in der II. Mitteilung hervorgehoben wurde, besonders geeignet, da zu dieser Zeit schon eine erhebliche Verankerung des Giftes seitens der Gewebe stattgefunden haben muß, wie wir aus dem ca. 8-fachen Ueberschuß von Antitoxin, welcher zu seiner Loslösung erforderlich ist, schließen können.

Wie bei den früheren Versuchen, so bestand auch jetzt wieder unsere erste Aufgabe darin, den Antitoxingehalt der Sera auszuwerten.

Nur einige der Sera waren mit einer genaueren Wertangabe versehen, und abgesehen davon mußte auch in Betracht gezogen werden, daß in der Zwischenzeit — zwischen der Werthbemessung von Kraus und der unseren liegt ein Zeitraum von ca. $\frac{1}{2}$ Jahr — eine Abschwächung eingetreten sein konnte.

Ueber diese Untersuchungen gibt folgende Tabelle Aufschluß.

Tabelle I.
Wertbemessung der von Kraus übersandten Sera.

I Magda		II Marius		III Kibitz		IV Mizzi		V Laudon		VI Hans		VII Lois		VIII Lift	
Prüfung auf 7-fach	Erfolg am 4. Tage	Prüfung auf 7-fach	Erfolg am 4. Tage	Prüfung auf 7-fach	Erfolg am 4. Tage	Prüfung auf 7-fach	Erfolg am 4. Tage	Prüfung auf 7-fach	Erfolg am 4. Tage	Prüfung auf 7-fach	Erfolg am 4. Tage	Prüfung auf 7-fach	Erfolg am 4. Tage	Prüfung auf 7-fach	Erfolg am 4. Tage
60	lebt	80	lebt	100	lebt	120	lebt	300	lebt	200	lebt	300	lebt	100	lebt
75	"	95	+4	120	"	140	+4	325	+4	215	+4	315	+4	125	"
80	+4	100	+3	130	"	160	+2	350	+3	225	+3	330	+3	130	+4
95	+3	120	+2	140	+4	250	+1	380	+2	250	+2 $\frac{1}{2}$			150	+3
140	+2	140	+1	160	+2					270	+2			175	+2
										290	+2			300	+1

Demnach enthielt Serum

I. Magda	80	Immunitätseinheiten
II. Marius	95	"
III. Kibitz	140	"
IV. Mizzi	140	"
V. Laudon	325	"
VI. Hans	215	"
VII. Lois	315	"
VIII. Lift	130	"

Vorstehende Werte wurden nun den folgenden Heilversuchen, in denen wir, wie bereits oben erwähnt, $1\frac{1}{2}$ Stunde nach der gleichmäßigen Vergiftung durch intrakardiale Injektion in eben derselben Weise das Serum injizierten, zugrunde gelegt. Zur Vergiftung bedienten wir uns desselben Giftes und derselben Dosis wie in den früheren Versuchen.

Tabelle II.

Heilversuch an Meerschweinchen mit den von Kraus übersandten Seris.

Gift 0,014 ccm in 1 ccm physiologischer Kochsalzlösung intrakardial, nach $1\frac{1}{2}$ Std. Serum ebenfalls intrakardial.

An- zahl I.E.	I Magda 80-fach	II Marius 95-fach	III Kibitz 140-fach	IV Mizzi 140-fach	V Laudon 325-fach	VI Hans 215-fach	VII Lois 315-fach	VIII Lift 130-fach
0,16	+4 +4 +6	+4 +5	+8 +6	+6 +5	+2 +9	+3 +4 +3	+8 +4	+8 +3 L +20
0,25	L +35 +13 L +24	+11 L +27	L +20 +9	L +32 L +22	L +24 L +32	+13 L +35 L +32	L +28 L +33	L +20 L +21 +9

Wenn wir diese Zusammenstellung näher betrachten, so sehen wir, daß, wie bei den in der II. Mitteilung berichteten Versuchen, auch hier bei sämtlichen Seris gleichmäßig die Dosis von 0,16 I.E. einen akuten Tod der Tiere nicht verhindern konnte. In dieser ganzen Serie ist nur ein einziges Tier vorhanden, das infolge größerer Widerstandsfähigkeit eine längere Lebensdauer aufweist. 0,25 I.E., dieselbe Dosis, welche

auch in unseren früheren Versuchen die Tiere vor dem akuten Tode schützte, vermag dies auch mit wenigen Ausnahmen in den jetzigen. Daß es sich bei den vorzeitig gestorbenen Tieren nur um wirkliche Ausnahmen, bedingt durch individuelle Eigentümlichkeiten, handelte, konnten wir stets durch eine Wiederholung des Versuches beweisen. In zwingender Weise ergibt sich indessen hieraus die Konsequenz, die wir auch schon in unserer I. Mitteilung betont haben, daß bei der verschiedenen Empfindlichkeit der Tiere eine Gesetzmäßigkeit nur auf Grund eines reichen Versuchsmaterials, nicht aber an der Hand einiger weniger oder gar nur eines einzelnen Versuches angenommen werden darf. Berechnen wir nun noch die mittlere Lebensdauer der Tiere bei den beiden Serumgaben, so ergibt sich bei der Dosis von 0,16 I.E. als durchschnittlicher Todestag der 6., und bei 0,25 I.E. der 23. Tag; der Tod erfolgte bei letzterer Dosis stets nach vorausgegangener Lähmung.

Diese Versuche haben nun in zweifacher Weise die Ansicht Ehrlichs von der Bedeutung der Antitoxineinheit für die Heilwirkung bestätigt, einerseits indem sie durch das völlig gleichmäßige Verhalten der Sera untereinander, trotzdem der Gehalt an Immunitätseinheiten der einzelnen zum Teil nicht geringe Unterschiede aufwies, den Beweis für die Gleichwertigkeit ihrer Immunitätseinheiten erbrachten; andererseits aber auch ergibt sich bei einer Gegenüberstellung der jetzigen und früheren Versuche eine solche absolute Uebereinstimmung, daß wir, ohne fehlzugehen, den Schluß ziehen können, daß für die Heilwirkung nicht die Herkunft noch ein anderes Moment, sondern nur ein Faktor in Betracht kommt, und zwar nur der Gehalt an Antitoxineinheiten.

II. Heilversuche an Kaninchen.

Von allgemein wissenschaftlichem Interesse schien es nun, experimentell einmal festzustellen, wie sich im Vergleich zu den Meerschweinchen Kaninchen derartigen Heilversuchen gegenüber verhalten. Wir wählten hierzu die bei den obigen Versuchen angewandte Methodik, indem wir nach Vergiftung durch Injektion in die eine Ohrvene $1\frac{1}{2}$ Stunde später das Serum in die Vene des anderen Ohres injizierten. Die Vergiftung erfolgte mit derselben Toxindosis (0,014) wie bei den Meerschweinchen. Wie wir in unserer I. Mitteilung bereits anführten, war die einfach tödliche Dosis unseres Giftes für Meerschweinchen und Kaninchen bei direkter Einverleibung in die Blutbahn ungefähr die gleiche und betrug ca. 0,005 ccm. Als Antitoxin benutzten wir das 2400-fache Serum P.-D., das uns auch in früheren Versuchen zur Ermittlung der Limiten gedient hatte.

Unser erstmaliger Versuch ist in folgender Zusammenstellung wiedergegeben.

Heilversuch an Kaninchen.

Gift 0,014 ccm in 1 ccm physiologischer Kochsalzlösung und Serum (P.-D. 2400-fach) intravenös, Differenz zwischen Gift- und Seruminjektion $1\frac{1}{2}$ Stunde.

Anzahl I.E.	Erfolg	Anzahl I.E.	Erfolg
0,12	† $2\frac{1}{2}$	0,25	davon
0,14	† 3	0,4	"
0,16	† 13	0,6	"
0,18	† 20	Kontrolle	† 3

Bei näherer Betrachtung dieser Versuchsserie werden sofort 2 Momente unsere Aufmerksamkeit auf sich lenken; es ist dies einmal die fast völlige

Kongruenz in der Heilwirkung der gleichen Antitoxinmengen bei Kaninchen und Meerschweinchen, und dann auch der gesetzmäßige Verlauf in der Versuchsreihe selbst. Die Differenz, welche einerseits zwischen den schützenden, andererseits den nicht schützenden Dosen bei beiden Tierarten besteht, ist nur gering. Die Dosis, welche bei Kaninchen den akuten Tod nicht zu verhindern vermag, ist 0,14 I.E., bei Meerschweinchen 0,16 I.E. Zwar heilt 0,25 I.E. die Kaninchen sicher, während Meerschweinchen bei ihr noch nach einigen Wochen infolge Lähmung zugrunde gehen. Es kann aber keinem Zweifel unterliegen, daß, wenn nicht bei letzteren eine besondere Empfindlichkeit gegen die Lähmung erregende Komponente des Giftes bestünde, auch die Meerschweinchen mit Sicherheit geschützt worden wären. Es resultiert also im allgemeinen bei Kaninchen und Meerschweinchen fast dieselbe Heilwirkung. Dieses Resultat muß überraschen. Stellt man nämlich die Blutmenge der beiden Tierarten, welcher das Antitoxin übergeben wurde, entsprechend dem Körpergewicht — 250 g beim Meerschweinchen und 1700 g beim Kaninchen — in Parallele, so hätte man bei der höheren Konzentration, in der sich das Serum im Meerschweinchenkörper befand, günstigere Bedingungen für das Zustandekommen der Heilung vermuten sollen als beim Kaninchen, wo die Verdünnung eine ca. 7-fach größere ist. Aus der beinahe völligen Uebereinstimmung der Heileffekte ergibt sich aber, daß der Mischungsfaktor keine besondere Rolle spielt.

Was nun den zweiten Punkt, den völlig gesetzmäßigen Verlauf dieser Versuche, betrifft, so stehen wir nicht an, zu erklären, daß wir derart gleichmäßig empfindliche Tiere nur einem glücklichen Zufall zu verdanken haben. Denn als einige Wochen später der Versuch wiederholt werden sollte und wir genötigt waren, Tiere einer erst wenige Tage vorher eingetroffenen Sendung zu verwenden, erhielten wir, wie nachstehende Tabelle zeigt, folgendes Resultat:

Heilversuche an Kaninchen.

Gift 0,014 ccm in 1 ccm physiologischer Kochsalzlösung und Serum (P.-D 2400-fach) intravenös, Differenz zwischen Gift- und Seruminjektion 1½, Stunde.

Anzahl I.-E.	Erfolg	Anzahl I.E.	Erfolg
0,16	†7 †7	0,225	†7
0,18	†7	0,25	†5 †7
0,2	†5		

Diese Tiere zeigten also im Vergleich zu den obigen eine nicht unerheblich geringere Widerstandsfähigkeit, selbst die früher sicher heilende Dosis von 0,25 I.E. läßt jetzt noch die Tiere an einem akuten Tode zugrunde gehen, ebenso macht sich jetzt auch eine geringe Unregelmäßigkeit im Verlaufe der Serie bemerkbar. Derart wechselnde Verschiedenheiten in der Resistenz sind bereits früher von uns beobachtet und in der I. Mitteilung ausdrücklich beschrieben worden. In vorstehendem Ergebnis finden somit unsere früheren Angaben eine willkommene Bestätigung. Gleichzeitig aber — und dies ist für spätere Untersuchungen von großer Wichtigkeit — entnehmen wir daraus, daß gerade infolge dieser Variabilität in der Resistenz Kaninchen für exakte diesbezügliche Untersuchungen nicht die geeigneten Versuchstiere sind.

III. Heilversuche an Meerschweinchen, bei denen das Gift intrakardial und das Serum subkutan verabfolgt wurde.

Nachdem nun von uns in den früheren und jetzigen Untersuchungen mit aller Evidenz die Tatsache, daß der Antitoxingehalt allein für die Heilwirkung der ausschlaggebende Faktor ist, erwiesen war, erschien es vom Standpunkt einer exakten Forschung wünschenswert, auch noch den Grund zu ermitteln, auf den das so andersartige Verhalten einzelner Sera, wie es Kraus und Schwoner beobachtet hatten, zurückgeführt werden muß. Bekanntlich hatten die genannten Autoren Gift und Serum subkutan injiziert; demgegenüber haben wir, indem wir den Angaben von Dönitz folgten, bereits mehrmals hervorgehoben, daß bei einem derartigen Verfahren infolge der individuell verschiedenen Resorptionsverhältnisse eine exakte Heilwertbestimmung nicht möglich sei, da es sich unserer Kenntnis entzöge, wieviel der injizierten Substanzen in einem gegebenen Augenblick in Aktion trete. Aus diesem Grunde schlossen wir, wie wir gesehen haben, dieses Verfahren in unseren Versuchen aus. Um nun aber auch aus eigener Anschauung uns ein Urteil bilden zu können über den Wert der Subkutanmethode, haben wir noch an einer größeren Zahl von Tieren Versuche ausgeführt, und zwar in der ausgesprochenen Absicht, die Wirkung des Antitoxins bei seiner subkutanen Einverleibung festzustellen. Zu diesem Zweck vergifteten wir die Tiere gleichmäßig mit derselben Giftdosis (0,014) und verabfolgten nach 1 Stunde das Serum stets in ca. 3,5 ccm Kochsalzlösung subkutan. Das Resultat dieser an 67 Tieren ausgeführten Versuche sehen wir in folgender Tabelle.

Tabelle III.

Heilversuche an Meerschweinchen.

Gift 0,014 ccm in 1 ccm physiologischer Kochsalzlösung intrakardial, nach einer Stunde das Serum (Serum P.-D. 2400-fach) subkutan.

Anzahl I.E.	Von den Versuchstieren starben am Tage															
	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.	12.	13.	14.	15.	16.
7	1	3		4	3	1		1								
14				4	1	1			1							
20		2		7	1	1	1		1							
30		1	1				1							1		
40				1	3											

Anzahl I.E.	Von den Versuchstieren starben am Tage														Außerdem wurden geheilt
	17.	18.	19.	20.	21.	22.	23.	24.	25.	26.	27.	28.	29.	30.	
7		L ¹⁾ 1					L 1	L 1							2
14															1
20								L 1							2
30								L 1							3
40							L 1		L 1	L 2	L 3	L 1		L 1	6

Fassen wir die in vorstehender Tabelle niedergelegten Versuche zusammen, so erhalten wir folgendes Ergebnis:

1) L = Tod nach Lähmung.

Zusammenfassende Uebersicht zu vorstehender Tabelle.

Anzahl I.E.	Anzahl der Versuchstiere	Von den Tieren		
		starben eines akuten Todes (innerhalb der ersten 7 Tage)	starben eines chronischen Todes	wurden geheilt
7	18	12 = 66 Proz.	4 = 22 Proz.	2 = 11 Proz.
14	8	6 = 75 „	1 = 12,5 „	1 = 12,5 „
20	16	12 = 75 „	2 = 12,5 „	2 = 12,5 „
30	10	6 = 60 „	1 = 10 „	3 = 30 „
40	15	1 = 6,6 „	8 = 53 „	6 = 39,6 „

Diese Zusammenstellung zeigt nun in vergleichbarer Weise, in welchem Maße die verschiedenen Serummengen die Vergiftung zu beeinflussen imstande waren. So sehen wir denn, daß bei 7 I.E. 66 Proz., bei 14 und 20 I.E. je 75 Proz. und bei 30 I.E. 60 Proz. der Versuchstiere akut, d. h. in den ersten 7 Tagen zugrunde gehen. Es besteht also unter diesen Prozentzahlen eine Uebereinstimmung, die man fast mathematisch genau bezeichnen könnte. Auf Grund dieser Ergebnisse wären wir also folgerichtigerweise zu dem Schluß genötigt, daß bei ein und derselben Vergiftung von ein und demselben Serum 7 I.E. dieselbe Wirkung aufweisen, wie 14, 20 und sogar 30 I.E. und umgekehrt. Einen derartigen Schluß zu ziehen, wäre absurd. Um nun dem Einwand zu begegnen, daß eine Verallgemeinerung auf Grund von Experimenten, die nur an einem Serum angestellt seien, nicht zulässig sei, haben wir noch an einem zweiten Serum, und zwar einem 100-fachen, die Versuche wiederholt und zwar, wie uns folgende Tabelle zeigt, mit genau demselbem Ergebnis. Auch hier sehen wir von den Tieren, die 7 bzw. 20 I.E. erhalten hatten, 75 Proz., von denen, die mit 30 I.E. behandelt waren, 62,5 Proz. eines akuten Todes sterben.

Tabelle IV.

Heilversuche an Meerschweinchen.

Gift 0,014 ccm in 1 ccm physiologischer Kochsalzlösung intrakardial, nach einer Stunde das Serum (Serum R. I. Send. 100-fach) subkutan.

Anzahl I.E.	Erfolg	Es starben demnach eines akuten Todes
7	+5 +4 +5 +11	von 4 Tieren 3 = 75 Proz.
20	+13 +5 +6 +5	„ 4 „ 3 = 75 „
30	L+32 +4 +4 L+38 L+4 +3 +7 dav.	„ 8 „ 5 = 62,5 „

Dieses außergewöhnliche Verhalten der Sera kann nur durch rein zufällige Faktoren bedingt sein. In der unterschiedlichen Giftempfindlichkeit kann der Grund nicht liegen, denn diese hätte sich auch in unseren früheren Versuchen, bei der doppelten intrakardialen Injektion bemerkbar machen müssen, was, wie wir gesehen haben, nicht der Fall war. Völlig hinfällig ist ferner von vornherein die Annahme, daß etwaige Verschiedenheiten in der Avidität die Wirksamkeit des Serums beeinflußt haben könnten, da ja stets nur dasselbe Serum verwendet worden ist. Das absolut gleichmäßige Verhalten so verschiedener Serumdosen hätte aber zu einem verhängnisvollen Irrtum führen können, wenn man an verschiedenen Seris nur mit einem oder wenigen Tieren und ohne eine vollständige Austitrierung, wie in obigen Versuchen, den Heilwert hätte bestimmen wollen. Dann allerdings hätte der Fall eintreten können, daß sich z. B. 7 I.E. eines niederwertigen Serums nicht nur nicht gleichwertig, sondern sogar noch wirksamer als diese erwiesen hätten. Dann

würde auch die Annahme einer verschiedenen Avidität die einfachste Erklärung für diese Differenzen abgeben haben. Unsere Beobachtungen lassen sich nur durch die Annahme individueller Verschiedenheiten erklären und zwar können es, da es nach unserer obigen Ausführung die differente Giftempfindlichkeit nicht ist, nur noch die variablen Resorptionsverhältnisse der einzelnen Tiere sein.

An der Hand dieser Tatsachen dürfte es nunmehr nicht schwer fallen, auch für die abweichenden Resultate von Kraus und Schwoner eine hinreichende Erklärung zu finden.

Aus der Tabelle III ergibt sich weiterhin, daß erst 40 I.E. in wirksamer, d. h. gleichmäßiger Weise gegen den akuten Tod zu schützen vermögen. — Der Tod des einen Tieres, welches am 4. Tage zugrunde ging, kann an diesem Gesamtergebnis nichts ändern, da ihm 14 Tiere gegenüberstehen, bei denen der Versuch einen völlig gleichmäßigen Verlauf nahm. — Vergleichen wir nun diese schützende Dosis mit den Serummengen, die in den entsprechenden Versuchen bei der intrakardialen bzw. intraperitonealen Injektion erforderlich waren, um denselben Effekt herbeizuführen, so ergibt sich folgendes bedeutsame Verhältnis:

Es waren notwendig eine Stunde nach der Injektion derselben Giftmenge

bei der intrakardialen Injektion	0,08 I.E.
bei der intraperitonealen Injektion	7,0 "
bei der subkutanen Injektion	40,0 "

Mit anderen Worten: Die Heilwirkung eines Serums war in unseren Versuchen bei direkter Einverleibung in die Blutbahn 500-mal größer als bei der subkutanen und, wie auch bereits in der II. Mitteilung gesagt, 80—90mal größer als bei der intraperitonealen Injektion. In diesen Zahlen ist uns ein anschauliches Bild gegeben von dem außerordentlichen Einfluß, den die Resorptionsverhältnisse auf die Heilwirkung eines Serums auszuüben in der Lage sind. In ihnen ist aber gleichzeitig der beachtenswerte Hinweis enthalten, diese Ueberlegenheit der Methode der direkten Einverleibung des Serums in die Blutbahn gegenüber der subkutanen Applikation auch in der ärztlichen Praxis nach Möglichkeit auszunützen.

Ferner folgt aus unseren Versuchen, daß man für die experimentelle Prüfung einer so wichtigen Frage, wie sie die Aviditätsverhältnisse des Toxins und Antitoxins darstellen, ein solch unzuverlässiges Verfahren, wie es die Subkutanmethode ist, nicht in Anwendung bringen darf.

Ueber einige weitere Fragen, die sich im Verlaufe unserer Untersuchungen ergeben haben, sind noch Versuche im Gange.

Nachdruck verboten.

Spezifische Behandlung bei experimenteller Tuberkulose.

Von Dr. W. Zeuner, prakt. Arzt in Berlin.

Da ich in mehreren Fällen von intensiver äußerlicher Anwendung der gewöhnlichen grünen Seife gute Einwirkungen auf skrofulöse Drüsen und tuberkulöse Gelenkentzündungen gesehen hatte, kam ich auf den Gedanken, flüssige Seife in Form subkutaner Injektionen an Tieren zu versuchen.

Im folgenden will ich nun berichten, wie ich versucht habe, experimentell erzeugte Tuberkulose bei Meerschweinchen günstig zu beeinflussen, was zu den schwierigsten Aufgaben der Laboratoriumsforschung gehört, weil bekanntlich Meerschweinchen der tuberkulösen Infektion ungemein leicht und schnell erliegen.

Wie ich bereits in No. 37 und 39 der Berl. tierärztl. Wochenschr. 1908 (Ein mit ölsaurem Natrium und Lecithin hergestelltes hochwertiges Tuberkulose-toxin) mitgeteilt habe, probierte ich zunächst methodisch und eingehend ölsaures Natrium, eine Seife von einheitlicher, gleichmäßiger Beschaffenheit in verschiedenen Konzentrationen in bezug auf seine Wirkungen an Meerschweinchen und Kaninchen in Form von subkutaner Einverleibung aus. Hierbei ergab es sich, daß hypodermatische Injektionen von Natrium oleinicum 1:60 Aqua gut vertragen und, wie die Obduktionen zeigten, glatt resorbiert wurden, während, wie Kobert und Rassmann festgestellt haben, Einspritzungen desselben Mittels (1:10—100 Aqua) in die Blutbahnen bei Tieren einen komatösen Zustand bewirken, und sobald die Injektionsflüssigkeit das Herz erreicht, Herzstillstand eintritt. Niemals kamen mir bei Einverleibung unter die Haut Abscesse, Embolien oder komatöse Zustände zur Beobachtung, ebensowenig wie Herztod. Selbst wenn 2 Pravaz-Spritzen voll (= 2,4 ccm) 1:60 auf einmal subkutan gegeben wurden, entstand weder Krankheit noch Tod. Auch intraperitoneal injiziert, wurde $\frac{1}{2}$ Spritze 1:50 vertragen und ohne Peritonitis völlig resorbiert. Bei 1:60 fanden sich unter der Haut keinerlei Reizerscheinungen oder Nekrosen. Bei stärkeren Konzentrationen von 1:10, 1:20, 1:30, 1:40, 1:45 fanden sich oft Nekrosen unter der Haut, was heftige Schmerzen im Gefolge hatte. Gesunde Kaninchen, die während 37 Tagen teils täglich, teils jeden zweiten Tag eine Pravaz-Spritze von 1:60 subkutan erhielten, nahmen während dieser Zeit an Gewicht 200—400 g zu, während das Kontrolltier 485 g zunahm, auch blieben sie danach am Leben und gesund.

6 tuberkulöse Meerschweinchen wurden von mir 3 Wochen lang täglich vom Tage der Infektion an je nach Größe mit $\frac{1}{2}$ oder 1 Pravaz-spritze voll (= 1,2 ccm) 1:60 subkutan gespritzt, worauf sie stark abmagerten, und zwar infolge der täglichen Einspritzungen. Nachdem sie darauf 14 Tage lang in Ruhe gelassen wurden, erholten sie sich wieder, jedoch erlagen sie 9—14 Wochen nach der Infektion der Tuberkulose, trotzdem sie in den letzten Wochen alle 3 Tage 0,5 ccm unter die Haut erhielten. 21—42 Injektionen des Natrium oleinicum 1:60 Aqua konnten demnach die generalisierte Tuberkulose nicht abwenden, sondern höchstens in ganz wenigen Fällen den Exitus unbeträchtlich verzögern, da die Kontrolltiere 13 Wochen am Leben blieben.

Eine ganze Reihe von anderen Oelseifen erwies sich bei Meer-

schweinchen aus dem Grunde als unbrauchbar, weil sie Nekrosen verursachten. Deshalb ging ich dazu über, mit Hilfe des ölsauren Natrium, welches sich in der nötigen Verdünnung als unschädlich und gut verwendbar gezeigt hatte, aus Tuberkelbacillen ein spezifisches Extrakt zu gewinnen, um festzustellen, ob sich auf diese Weise ein Mittel erhalten ließe, welches die Tuberkulose meiner Versuchstiere günstig beeinflussen könnte.

Hierzu benutzte ich Bacillen des Typus humanus von derselben 6 Wochen alten Glyzerin-Agarkultur, mit der die Tiere infiziert worden waren. In 50 ccm einer Lösung von 1 Teil Natrium oleinicum in 60 Teilen destillierten Wassers brachte ich 50 Normalösen Tuberkelbacillen hinein und ließ dieses 48 Stunden im heizbaren Brieger-Mayerschen Schüttelapparat schütteln. Hierauf wurde 1 Stunde lang das Kölbchen im Wasserbade auf etwa 72° C erhitzt, um die Bacillen sicher abzutöten und gründlich zu extrahieren resp. zu verseifen, und dann $\frac{1}{2}$ Stunde lang elektrisch bei einer Tourenzahl von 2000 zentrifugiert. Die vom Sediment abgegossene Flüssigkeit wurde dann noch durch Kieselgurfilter filtriert. Das so erhaltene Filtrat stellt eine seifige, opalisierende Flüssigkeit dar, die im Eisschrank gut haltbar ist.

Diese stark verdünnte, flüssige Schutzseife nenne ich Specificum Ts.

Die Behandlung der am rechten Hinterschenkel in eine Hauttasche mit je 1 Normalöse Tuberkelbacillen infizierten Meerschweinchen 1 und 2 leitete ich so ein, daß ich 15 Tage nach der Infektion, als sich an der Seite der Impfung dicke, große Drüsen fühlen ließen, 1,2 ccm des Präparates unter die Rückenhaut spritzte. 5 Tage später wurde dieselbe Dosis verabfolgt, 7 Tage darauf 1 ccm, wiederum 7 Tage später 0,5 ccm, abermals 7 Tage später 0,5 ccm, 7 Tage darauf 1 ccm, 8 Tage später 0,5 ccm, nach weiteren 7 Tagen nochmals 0,5 ccm und nun alle 3, höchstens 4 Tage 0,5 ccm.

Bei einem der Versuchstiere (1) entwickelte sich an der Infektionsstelle ein großer Absceß, der jedoch im Verlaufe der nächsten Monate allmählich unter dem Einfluß der Schutzseife verheilte. Bei den anderen tuberkulösen Tieren, die kein spezifisches Präparat, sondern nur ölsaures Natrium erhielten, heilten derartige Abszesse der Impfstelle nicht aus blieben vielmehr bis zum Tode unter ständiger Vergrößerung bestehen.

Die Gewichtsverhältnisse der mit Schutzseife behandelten Tiere ergeben sich aus beistehender Tabelle:

	9. Juli	14. Juli	16. Aug.	8. Sept.	7. Okt.	24. Okt.	9. Nov.	17. Nov.	25. Nov.	1. Dez.	4.
1	—	202	224	260	265	255	280	245	260	255	
2	—	251	282	310	310	270	280	280 tot	—	—	
3	264	—	241	265	325	—	272	262	250	230 tot	

Die Gewichtsverhältnisse der Kontrolltiere waren folgende:

	9. Juli	14. Juli	7. Aug.	12. Aug.	21. Aug.	5. Sept.	7. Okt.	12. Okt.	16.
4	—	317	340	317	293	290	340	—	324
5	—	309	354	377	373	400	450	352 tot	—
6	373	—	330	—	—	310 tot	—	—	—

Zu den Versuchstieren 1 und 2 gehören die Kontrolltiere 4 und 5 zum Versuchstier 3 die Kontrolle 6.

Tier 1 hat die Kontrollen um mehr als 7 Wochen überlebt. Es hat im ganzen 25 subkutane Injektionen von 0,5—1,2 ccm des Specificum Ts

= 17 ccm bekommen. Bei der Obduktion fand sich rechts an der Infektionsstelle eine große, verkäste Drüse, links 3 kleinere, geschwollene Drüsen. Leber sehr vergrößert, rot, voll Knötchen. Milz aufs 4-fache vergrößert, voll großer Knoten. Lungen voll Tuberkeln. Axillardrüsen geschwollen.

Tier 3 hat die Kontrolle 6 um 13 Wochen überlebt und ist erst 21 Wochen nach der Infektion verendet, trotzdem es mit hochvirulenten Bacillen von menschlichem Sputum infiziert war. Es erhielt 3 Tage nach der Infektion die erste Einspritzung von 0,5 ccm ölsaurem Natrium 1:60 Aqua und weiterhin bis zur 6. Woche ebensolche Injektionen aller 3 Tage, worauf aller 6—7 Tage 0,5—1,0 ccm des Präparates Ts unter die Haut gespritzt wurde, und zwar die ersten beiden Male je 1,0 ccm, dann 0,5 ccm. Bei der Sektion fand sich rechts eine große verkäste Drüse, links nur eine wenig geschwollene Drüse. Leber dunkelrot, nicht vergrößert, enthält nur ganz spärliche Tuberkel. Milz fast gar nicht geschwollen, spärliche Tuberkel. Lungen voll zahlreicher großer und kleiner Knoten. Nieren normal.

Tier 2 ist 18 Wochen nach der Infektion verendet, es hat demnach 6 Wochen länger als die Kontrolltiere gelebt und hat im ganzen 22 Injektionen = 15,5 ccm des Specificum Ts erhalten. Bei der Sektion, einen Tag nach der letzten Einspritzung, fanden sich rechts und links Ketten von geschwollenen, außen geröteten Drüsen mit stark gefüllten Gefäßen, links sowie rechts war je eine Drüse der Kniebeugenfalte mit dünnflüssigem Eiter gefüllt. Die Milz war wenig vergrößert, dunkelrot, die Leber dagegen mächtig geschwollen, fettig. Gallenblase sehr stark mit hellgrüner Galle gefüllt. In Milz und Lungen fanden sich nur spärliche Knötchen, dagegen in der Leber massenhafte große und kleine Knoten sowie Cysten. Nieren nicht entzündet.

Recht bemerkenswert ist Meerschweinchen 3. Dieses wurde mit bacillenhaltigem Sputum einer an akuter, schnell verlaufender Phthisis im 3. Stadium erkrankten Patientin subkutan infiziert, ebenso wie das Kontrolltier 6. Während nun die Kontrolle 8 Wochen später an generalisierter Tuberkulose verendete, also es sich in diesem Falle um hochvirulente Bacillen handelte, blieb Tier 3, trotzdem dasselbe nach 3 Wochen ein dickes Drüsenpaket an der Impfseite aufwies und bald auch die Drüsen der anderen Körperseite answollen, 13 Wochen länger am Leben, weil es im Verlaufe von 21 Wochen im ganzen erst 14 Injektionen von ölsaurem Natrium 1:60 und dann 15 solche von dem Specificum Ts = 8,5 ccm bekam.

Besonders erwähnenswert ist noch, daß sich weder bei den vielen Wochen lang fortgesetzten subkutanen Einspritzungen des Natrium olei in der Verdünnung 1:60 Aqua noch auch bei den mit dem spezifischen Präparat behandelten Tieren jemals Nephritis vorfand.

Der (außer bei Fall 3 und 6) verwendete Bacillenstamm erwies sich als nicht stark virulent, denn die Kontrolltiere starben erst 13 Wochen nach der Infektion an allgemeiner Tuberkulose. Nachdem nun aber die mit dem Specificum Ts behandelten, tuberkulösen Meerschweinchen (und zwar diese allein) die Kontrolltiere um 5—13 Wochen überlebt haben und die rechts und links vorher stark geschwollenen Drüsen sich deutlich fühlbar wieder verkleinert haben, so stehe ich nicht an, dies für den Erfolg der Behandlung mit dem spezifischen Mittel zu erklären. Während die anderen 19, mit Oelseife behandelten, zur selben Zeit infizierten Meerschweinchen längst sämtlich dem Tode verfallen waren,

gelang es, durch Einspritzungen mit dem neuen Präparat alle 3 spezifisch behandelten Tiere ganz erheblich länger am Leben zu erhalten.

Nachdem die Versuche nunmehr 6 Monate gedauert haben, will ich nicht länger zögern, die Ergebnisse derselben bekanntzugeben, um auch beim Menschen die Anwendung des Präparates zu ermöglichen.

Vielleicht wird sich das Präparat noch wirksamer gestalten lassen, wenn anstatt schwach virulenter Tuberkelbacillen, wie im vorliegenden Falle geschehen, hochvirulente genommen werden und der Gehalt an Bacillen erhöht wird. Man kann auch die bacillenhaltige Flüssigkeit vor dem Erhitzen 4 Tage lang bei 37° C schütteln lassen, wobei darauf zu achten ist, daß der sich oben in Kölbchen absetzende, ausgeschüttelte Rand, aus bakteriellem Material bestehend, öfters heruntergespült wird, und nach dem Erhitzen wiederum 3 Tage lang schütteln lassen, damit durch das lange Schütteln die Bakterien noch gründlicher ausgelaugt und möglichst gehaltreiche Extrakte gewonnen werden (D. R.-P. angemeldet.)

Es steht zu hoffen, daß es gelingt, mit einem derartig bereiteten Präparat die lebensverlängernde und heilende Wirkung desselben mehr und mehr zu erhöhen, wenn ganz erheblich mehr Bacillen dazu verwendet werden.

In dem neu erschienenen Handbuch der Immunitätsforschung von Kraus und Levaditi wird mitgeteilt, daß Robert Koch schon vor Jahren Tuberkelbacillen durch $\frac{1}{10}$ Normalnatronlauge 3 Tage lang bei Zimmertemperatur mazerierte. Nach dem Abfiltrieren der ungelöst gebliebenen Massen und Neutralisation des Filtrates erhielt er eine schwach gelbliche Flüssigkeit, das Präparat T A. Die dabei in Lösung gegangenen Stoffe führten aber auch etliche — natürlich sicher abgetötete — Tuberkelbacillen mit sich, die bei subkutanen Injektionen in hohen Dosen bei den damit behandelten Kranken zur Bildung steriler Abscesse führten. Wegen dieser unerwünschten, lästigen Abscesse, die das Präparat T A hervorrief, und die ohne Inzision nicht heilten, mußte schließlich R. Koch von einer weiteren Verwendung desselben Abstand nehmen, trotzdem, wie mir von zwei namhaften Mitarbeitern Kochs mündlich berichtet wurde, diese Tuberkelbacillenseife von guter Einwirkung auf den Verlauf der Tuberkulose war. Eine große Anzahl von Patienten wurde damals damit behandelt. Bei dem oben von mir angegebenen Specificum Ts sind Abscesse an den Injektionsstellen nicht ein einziges Mal aufgetreten, so oft das Mittel Meerschweinchen auch verabreicht wurde.

Im ganzen wurden zu meinen Versuchen 54 Meerschweinchen und 6 Kaninchen verwendet. Aus äußeren Gründen konnten leider die Erfolg versprechenden Vorversuche nicht fortgesetzt werden.

Bei dem vorliegenden Präparat handelt es sich um ein modifiziertes Tuberkulin, dessen Vorteile wohl darin bestehen dürften, daß (vielleicht durch die Oelsäure) gerade nur diejenigen Stoffe aus den Tuberkelbacillen extrahiert und verseift werden, die keine Abscesse hervorbringen aber spezifisch günstig auf den Verlauf der Krankheit einwirken. Der Wert des neuen Verfahrens scheint mir hauptsächlich darin zu beruhen, daß dasselbe Giftstoffe der Tuberkelbacillen durch intensive, warme Verseifung in Schutzstoffe umwandelt. Aus den angeführten Tierversuchen geht hervor, daß auf diesem Wege etwas zu erreichen sein wird, zumal da die oben erwähnten zahlreichen Heilversuche an Menschen, die Robert Koch schon mit dem in mancher Beziehung ähnlich hergestellten und nach ähnlichen Grundsätzen gewonnenen Präparat T A

vorgenommen hat, in dieser Hinsicht gewichtig genug mitsprechen. Ich habe im ganzen 7 derartige verschiedene Präparate aus Tuberkelbacillen hergestellt und an Tieren versucht. Von allen erwies sich das angeführte als das allein brauchbare und Nutzen bringende, obwohl es sicher aus viel zu wenig Bacillen hergestellt war.

Nach mancherlei Fehlschlägen ergab sich aus meinen diesbezüglichen Versuchen, daß gerade die 1-stündige Erhitzung der flüssigen Oelseife auf etwa 72°C aus den Tuberkelbacillen diejenigen Stoffe herausholt und durch einen eigenartigen, zum Teil heißen Verseifungsprozeß entsiftet, die praktisch zur unmittelbaren, subkutanen Einverleibung bei experimenteller Tuberkulose verwendbar sind, während andere Hitzegrade keine guten Resultate lieferten. Je nach der Dauer der Erhitzung und je nach dem Temperaturgrade erhält man nämlich mit Alkalien aus den Tuberkelbacillen recht verschiedene Präparate, deren Wirksamkeit viel zu wünschen übrig läßt oder direkt schädlich ist. So ist z. B. durch Aronson bekannt, daß ein aus den Bacillenleibern bei 130°C mit verdünnter Natronlauge extrahiertes Gift gesunde Meerschweinchen in 4–6 Wochen unter Kachexie ohne das anatomische Bild der Tuberkulose tötet. Dahingegen werden durch die vorsichtig gewählte, niedrigere Erhitzung auf etwa 72°C während einer Stunde und durch vorheriges längeres Schütteln der genau ausprobierten Verdünnung der Oelseife die Tuberkelbacillen dermaßen verseift und ausgelaugt, daß sie giftfreie, spezifische Schutzstoffe liefern, die mit Vorteil in den üblichen Mengen subkutan injiziert werden können, ohne Kachexie zu machen oder Eiterungen, Nekrosen und unliebsame Entzündungen an den Injektionsstellen zu verursachen.

Es liegt nun weiter der Gedanke nahe, den ausgeschleuderten Bodensatz der Oelseifenlösung, nachdem diese durch reichlichere Verwendung von bakteriellem Material verstärkt worden ist, zur Schutzimpfung in die Haut von Menschen und Rindern — ähnlich der Schutzpockenimpfung — zu verwenden, um auf diese Weise einen gewissen Impfschutz gegen Erkrankungen an Tuberkulose zu versuchen. Nachdem wir das 100-jährige Jubiläum der Jennerschen Kuhpockenimpfung vor kurzem begangen haben, dürften solche Experimente angebracht erscheinen. Auch zu kutanen diagnostischen Impfungen kann das Sediment versucht werden.

Bei der großen Wichtigkeit der Frage, um die es sich hierbei handelt, ist es natürlich erforderlich, noch eingehende und genaue Untersuchungen über die Einwirkungen des neuen Specificum an Tieren und Menschen anzuführen. Hierzu anzuregen, ist der Zweck dieser Veröffentlichung. Man muß hierbei berücksichtigen, daß, wie in dem Lehrbuch der spezifischen Diagnostik und Therapie der Tuberkulose von Bandelier und Boepke gesagt wird, die Heilung künstlich infizierter Meerschweinchen mit Tuberkulinpräparaten nur wenigen Forschern geglückt ist, die sich besonders eingehend mit diesen äußerst mühevollen Arbeiten befaßt haben (und wie ich hinzufügen möchte, nur in ganz seltenen Fällen geglückt ist), weil gerade künstlich infizierte Meerschweinchen nach Einverleibung auch der geringsten Mengen lebenden, tuberkulösen Materials selbst in einer Verdünnung von 1:100000000 ausnahmslos an allgemeiner Tuberkulose zugrunde zu gehen pflegen, denn die experimentelle Infektion des kleinen Tierkörpers ist im Verhältnis wohl immer zu stark. Deshalb hat z. B. v. Behring bei seinen Studien der Tuberkuloseimmunisierung das Experimentieren mit Meerschweinchen und

Kaninchen der großen Schwierigkeiten wegen aufgegeben, und auch Neufeld, der langjährige Mitarbeiter Kochs, ist der Ansicht, daß die Per-
suchtinfektion der Rinder, deren milderer Verlauf und Neigung zu Spon-
tanheilungen bekannt ist, als Analogie für die menschliche Tuberkulose
weit eher heranzuziehen ist. Aus diesen Gründen ermutigen die von
mir angestellten Untersuchungen zur Nachprüfung an Rindern und
Menschen. Nach Kochs grundlegenden Arbeiten erwies sich nämlich
andererseits der Mensch außerordentlich viel empfindlicher für die Wir-
kung des Alt-Tuberkulins als das Meerschweinchen.

Da die experimentelle Infektion der Meerschweinchen fast alle Organe befällt und in wenigen Wochen unter kolossalen Gewebsveränderungen zum Tode führt, während die Tuberkulose der Menschen meist einen ausgesprochen chronischen Charakter besitzt und mehr lokalisiert verläuft, so liegen bei letzterer die Heilungsbedingungen für die spezifische Therapie ganz außerordentlich viel günstiger, und darum ist es wünschenswert, das neue Specificum beim Menschen anzuwenden. Das Specificum Ts, welches durch Zusatz von 0,5 Proz. Phenol haltbar gemacht werden kann, ist völlig gebrauchsfertig, ohne erst weitere, für den beschäftigten Praktiker recht umständliche und zeitraubende Verdünnungen zu erlangen. Hierdurch wird seine Anwendung jedem Arzte leicht und bequem gemacht.

Schlüsse.

1) Zur ätiologischen Therapie der Tuberkulose eignen sich subkutane Injektionen des Specificum Ts, bestehend in dem Filtrat einer Lösung von ölsaurem Natrium 1:60 Aqua, welche nach einem besonderen Verfahren mit geschüttelten und dann durch lang andauernde Erhitzung abgetöteten Tuberkelbacillen bereitet wird.

2) Das Mittel wirkt bei Tuberkulose erwiesenermaßen lebensverlängernd.

3) Diese flüssige Oelseife, die spezifische Schutzstoffe enthält, verursacht bei richtiger hypodermatischer Einverleibung weder Abscesse noch andere spezifische Schädigungen bei den Versuchstieren.

4) Hiermit ist ein experimentell erprobtes, atoxisches, mildes, spezifisches Präparat gefunden, welches auf Tuberkulose günstigen Einfluß ausübt.

FLAVOR & AROMA

Nachdruck verboten.

Untersuchungen betreffend die Erzielung von Keimfreiheit bei milzbrandsporenhaltigen Fellen und Häuten.

[Aus dem hyg. Laboratorium (medizinische Abteilung) des Kgl. württemb. Medizinalkollegiums (Obermedizinalrat Dr. Scheurlen).]

Von Dr. Brekle,

Kgl. württemb. Oberarzt, kommandiert zum Kgl. Medizinalkollegium.

Wie aus den Arbeiten aus dem Kaiserl. Gesundheitsamte Bd. XXV zu ersehen ist, hat der Reichsgesundheitsrat im Jahre 1904 ein Gutachten bezüglich des Auftretens des Milzbrandes unter dem Rindvieh im Schmeiegebiet (Kgl. Preuß. Regierungsbezirk Hohenzollern) dahin abgegeben, daß als die Ursache der Milzbrandsterblichkeit im Schmeiegebiet die Wildhautgerbereien Ebingens anzusehen seien, indem von hier aus die Krankheitskeime mit den Abwässern in den Schmeiebach gelangten und von dem Vieh mittels des Trinkwassers oder durch infiziertes Futter von den Wiesen aufgenommen würden. Die in dem Gutachten des Reichsgesundheitsrates vorgeschlagenen Maßregeln zur Bekämpfung der Milzbrandverbreitung im Schmeiegebiet — Regulierung des Schmeiebachs, Kanalisation der Stadt Ebingen mit Reinigung der die Gerbereiabwässer enthaltenden Kanalwässer, Desinfektion der Weichwässer und Verbot des Weichens der Felle im Schmeiebach — ließen sich aus verschiedenen Gründen nicht ohne weiteres durchführen, und die empfohlene Desinfektion der Abwässer war deshalb nicht möglich, weil ein wirksames, praktisch brauchbares Desinfektionsverfahren nicht bekannt war und ist. Eine durchgreifende Kanalisation in Ebingen ist jetzt im Gange, wird jedoch erst in Jahren vollendet sein, an die sich dann die Erbauung einer Kläranlage zur Reinigung der gesamten Abwässer anschließen dürfte. Es ergab sich also in dieser Richtung vorläufig keine Möglichkeit, der Verbreitung des Milzbrandes im Schmeiegebiet durch die Gerbereiabwässer Ebingens sofort in wirksamer Weise zu steuern.

Von verschiedenen Seiten sind aus diesem Anlaß Versuche zur Abtötung der Milzbrandkeime in den Fellen durch Desinfektionsmittel anstellt worden, jedoch wurde ein Erfolg nur erreicht auf Kosten der Felle, die durch das Desinfektionsverfahren mehr oder weniger geschädigt wurden. Wie gering die Zahl der Desinfektionsmittel ist, die Milzbrandsporen in relativ kurzer Zeit abzutöten vermögen, ist bekannt. E. v. Es-march hat in seiner Arbeit „Die Milzbrandsporenbildung auf Fellen und ihre Desinfektion“¹⁾ Versuche veröffentlicht, wobei er milzbrandhaltige Felle, teils sporenlose, teils sporenhaltige, verschiedenen Desinfektionsproben unterwirft. Es gelang ihm, sporenlose Felle mit 1-prom. Karbollösung und mit 1-prom. Formalinlösung nach 24-stündiger Einwirkung keimfrei zu machen und sogar sporenhaltige Felle mit 1-prom. Kochsalzsublimatlösung nach 3 und 7 Stunden zu sterilisieren. Diese Versuche wurden von Herzog²⁾ und in größerem Maßstabe von Kister und Trautmann³⁾ nachgeprüft, die teilweise andere Resultate erhielten.

1) Festschrift zum 60. Geburtstage von Robert Koch. p. 264.

2) Herzog, Experimentelle Beiträge zur Formaldehydwasserdampfdesinfektion. Centralbl. f. Bakt. etc. Abt. I. Orig. Bd. XXXIV. p. 170.)

3) Kister u. Trautmann, Ueber Versuche mit Formaldehydwasserdampf nach dem Verfahren v. Es-marchs. (Zeitschr. f. Hyg. Bd. XLVI. p. 379.)

Auch hält Xylander in seiner Arbeit „Beiträge zur Desinfektion von milzbrandhaltigen Häuten“¹⁾ eine Anwendung von Sublimat zur Desinfektion für ungeeignet wegen der Vergiftungsgefahr und der Schädigung der Häute.

Beim Antritt meines Kommandos erhielt ich von Herrn Obermedizinalrat Dr. Scheurlen den Auftrag, auf anderem Wege als dem der direkten Abtötung der Sporen die Keimfreimachung von milzbrandsporenhaltigen Häuten zu versuchen. Es war aus früheren Versuchen im Laboratorium bekannt, daß bei Temperaturen von etwas über 42° C — der damalige einzige Brutschrank des Laboratoriums hielt die hohe Temperatur nicht genau — Milzbrandsporen in Bouillon oder Serum auskeimen und bei dieser Temperatur sicher keine Sporen mehr bilden. Auch sollte die Frage untersucht werden, ob nicht durch Wachstum bei solch höheren Temperaturen ein solche Abschwächung der Virulenz der Milzbrandkeime stattfindet, daß die Gefahr der Uebertragung auf das Rindvieh beseitigt oder doch eingeschränkt wird.

Zunächst galt es, die genaue Temperatur des Auskeimens der Sporen bei gleichzeitiger Verhinderung der Sporenbildung festzustellen; sodann war der Versuch auf Milzbrandhäute zu übertragen.

Die in der Literatur sich findenden Angaben über Sporenbildung bei Milzbrand sind nicht übereinstimmend. Baumgarten²⁾ sagt, über 34° C bleibe sie in der Regel aus; Pasteur stellt es als Faktum auf, daß Milzbrandbacillen in neutraler Hühnerbouillon zwischen 42 und 43° C keine Sporen bilden, was aber von Koch, Gaffky und Loeffler als nicht zutreffend befunden wurde, indem dieselben bei solchen Temperaturen eine exquisite Sporenbildung beobachteten³⁾. — Vor Beginn meiner Versuche wurde, um einen Milzbrandstamm mit erhöhter Virulenz zu erhalten, von dem vorrätigen Laboratoriumsmilzbrandstamm ein Meerschweinchen subkutan infiziert; nach erfolgtem Tode desselben, 2½ Tage nach der Impfung, wurden aus der Milz auf Agar Milzbrandkulturen gezüchtet, die dann, um möglichst rasch Sporenbildung zu erzielen, vorerst in einer Temperatur von 35° C gehalten wurden.

I. Versuchsreihe.

Es wurde von der neu gewonnenen Milzbrandkultur, die nachweislich nur Sporen enthielt, mit 0,8-proz. steriler physiologischer Kochsalzlösung eine Aufschwemmung hergestellt und davon auf kurz vorher in Petri-Schalen gegossenen und erstarrten gewöhnlichen Nähragar geimpft; die Bebrütung erfolgte bei einer Temperatur zwischen 39 und 40° C. Bei diesen und allen folgenden Versuchen wurden Kontrollplatten im Brutschrank bei 37° gehalten. Schon am nächsten Tage waren reichlich Kulturen gewachsen. Das mikroskopische Präparat zeigte Fäden von hyaliner Beschaffenheit; am 2. Tage fanden sich in den Fäden liegende Sporen, nach weiteren 3 Tagen waren die Milzbrandfäden mit vielen ovalen Sporen besät, auch waren einzelne freie Sporen zu erkennen.

Somit findet bei einer Temperatur von 39—40° C auf Agar eine Sporenauskeimung und wiederum Sporenbildung statt.

Agarplatten in derselben Weise geimpft, wie beim eben beschriebenen I. Versuche, wurden hierauf einer Temperatur zwischen 42 und 43° C

1) Arbeiten a. d. Kaiserl. Gesundheitsamt. Bd. XXV. 1907. p. 457.

2) v. Baumgarten, Lehrbuch der pathologischen Mykologie. 1890. p. 431.

3) Mitteil. a. d. Kaiserl. Gesundheitsamt Bd. II. p. 48.

ausgesetzt. Nächsten Tages waren für das bloße Auge kaum sichtbare Kulturen gewachsen; unter dem Mikroskop waren feine lockenartige Milzbrandkulturen zu erkennen; auch nach weiteren 24 Stunden hatten sich nur spärliche Kolonien entwickelt; ein Abstrichpräparat zeigte sehr schöne hyaline Fäden, teilweise etwas aufgetrieben, Sporen waren nicht zu erkennen.

In der Erwägung, es möchte die hohe Temperatur allzusehr austrocknend auf den Agarnährboden und damit entwicklungshemmend auf die Milzbrandsporen wirken, wurde ein analoger Versuch auf Glycerinagar angesetzt; es zeigte sich in der Folge, daß auf diesem Nährboden die Kulturen, wenn auch nicht gerade reichlich, doch nicht so schwach wie auf gewöhnlichem Agar zur Entwicklung kamen. Daher wurde in den folgenden Versuchen nur noch Glycerinagar verwendet.

Nach 2 Tagen fanden sich im Präparat einerseits Fäden, die meistens ein gleichmäßiges hyalines Aussehen hatten, vielfach gequollen, jedoch zum Teil auch gekörnt waren, so daß man den Eindruck eines körnigen Zerfalls erhielt, andererseits waren aber auch einzelne wenige, anscheinend Sporen ähnliche, rundlich-ovale Körper zu sehen; nach weiteren 24 Stunden konnten mit Sicherheit freie Sporen im Präparate nachgewiesen werden; das gefärbte Präparat zeigte neben solchen freien Sporen teilweise sich schlecht färbende Fäden, ein Beweis, daß bei einer Temperatur von 42–43° C Milzbrandbacillen teilweise der Degeneration verfallen, teilweise noch Sporen bilden.

Beim III. Versuche wurden die Milzbrandsporen auf Glycerinagar einer Temperatur von 43–44° C ausgesetzt. Auch hier zeigte sich etwas langsames und spärliches Wachstum, doch hatten sich nach 1½–2 Tagen die nach 24 Stunden schwach sichtbaren Kulturen schon zu größeren Kolonien entwickelt. Das mikroskopische Präparat aus der Mitte der Kolonien zeigte überall Zerfallsprodukte, vom Rande der Kulturen abgenommen Fäden teils von hyalinem, teils gekörntem Aussehen; von Sporenbildung war nichts zu sehen, auch nicht nach 5–6 Tagen. Auf noch längere Zeit erstreckte sich die Beobachtung nicht.

Es läßt sonach eine Temperatur von 43–44° C Milzbrandsporen wohl auskeimen, eine Neusporenbildung erfolgt jedoch nicht.

Es folgten noch Versuche mit Temperaturen von 44–46° C, die aber insofern ein negatives Resultat ergaben, als auf Glycerinagar überhaupt kein Wachstum mehr erfolgte, wohl infolge der allzurachen Austrocknung des Nährbodens, auch änderte sich das Resultat durch Einlegen feuchten Filtrierpapiers in die Schälchen nicht wesentlich.

Das Ergebnis dieser ganzen Versuchsreihe wurde bestätigt durch analoge Versuche mit Bouillon als Nährboden. Bouillon in Reagenströhrchen wurde mit einer Platinöse Sporensuspension geimpft und während der Bebrütung regelmäßig öfters geschüttelt, um dem Sauerstoff der Luft Zutritt zu verschaffen. Es ergab sich bei einer Temperatur von 43–44° C nach 24 Stunden makroskopisch ein mäßiges, aber deutliches schleierartiges Wachstum. Im mikroskopischen Präparate fanden sich ganz wenige freie Sporen vor. Nach 48 Stunden waren auch diese verschwunden. Da der mikroskopische Befund allein nicht als ausschlaggebend angesehen werden kann, wurde der Nachweis auch damit erbracht, daß von der schleimigen Milzbrandmasse, die sich auf dem Grund der Bouillon gebildet hatte, in Lymphtröhrchen entnommen wurde, die dann an beiden Enden vorsichtig zugeschmolzen und im Wasserbad einer Temperatur von 80° C 5 Minuten lang ausgesetzt wurden. Das erhitze

Material wurde dann auf Agar ausgestrichen. Mit diesem Kulturverfahren ergaben sich aus dem Milzbrand, der 24 Stunden im Brutschrank bei 43—44° C gehalten war, noch wenige Milzbrandkolonien, nach 48 Stunden blieb ein Wachstum aus. Auch nach wochenlanger Beobachtung konnten niemals mehr Sporen festgestellt werden, während durch Kontrollversuche bei 37° die Anwesenheit von lebenden Milzbrandbacillen sich stets nachweisen ließ.

Weitere Versuche wurden bei einer Temperatur von 44—45° C angestellt; hier erfolgte ein vollständiges Auskeimen aller Sporen erst nach 3—4 Tagen. Bei einer Temperatur von 45—46° C zeigte sich in Bouillon makroskopisch sehr spärliches Wachstum, mikroskopisch waren neben einzelnen Sporen kurze aufgequollene und gekörnte Milzbrandfäden zu sehen; auch nach 3, 4 und 5 Tagen waren noch Sporen nachweisbar. Es ist anzunehmen, daß hier nur ein Teil von Sporen zur Keimung gelangte, ein anderer nicht.

Mit diesen vollkommen übereinstimmende Ergebnisse erzielte ich, wenn an Stelle von Nährbouillon Blutserum als Nährboden verwendet wurde.

II. Versuchsreihe.

Ehe zu Fellversuchen geschritten wurde, wurde die Virulenz der in verschiedenen Temperaturgraden gehaltenen Milzbrandkulturen gegenüber einzelnen Tierspecies geprüft.

Bekanntlich fanden Koch, Gaffky und Loeffler bei einer Nachprüfung des Pasteurschen Immunitätsverfahrens, daß „bei 42,8° C am 6., bei 42,6° C am 10. Tage die Virulenz des Mäusemilzbrandes erreicht wird, d. h. derjenige Virulenzgrad, bei dem die Milzbrandbakterien zwar noch Mäuse, aber nicht mehr größere Tiere wie Kaninchen, Hammel töten“¹⁾. Toussaint benützte zur Abschwächung von Milzbrandbacillen Temperaturen von 55° C 10 Minuten lang, Chauveau ein Erwärmen auf 47° C während 3 Stunden, worauf der Milzbrand für Meerschweinchen ungefährlich wurde.

Vor Beginn der eigentlichen Versuche wurde festgestellt, daß zur Abschwächung des Milzbrandes bei diesen Temperaturen Wachstum gehört, denn Milzbrandsporen in Wasser aufgeschwemmt und bei 43—44° C 6 Wochen lang im Brutschrank gehalten, hatten von ihrer Virulenz Kaninchen und Meerschweinchen gegenüber nichts eingebüßt, offenbar deshalb, weil sie in Wasser gar nicht auszukeimen vermochten.

Zu meinen Versuchen verwandte ich in stark verdünnter Suspension Milzbrandsporen, die imstande waren, Meerschweinchen in 1½—2 Tagen zu töten, und als Nährboden Bouillon und Rinderserum. Als Versuchstiere dienten vorerst zu den orientierenden Versuchen Meerschweinchen. Die geimpften Bouillon- und Serumröhrchen wurden verschiedenen Temperaturgraden ausgesetzt. Bei einer Temperatur von 45—46° C ließ sich sowohl nach 24, wie nach 48 Stunden eine Virulenzabschwächung nicht bemerken, denn die Meerschweinchen, die mit in solchen Temperaturgraden gehaltenen Kulturen nach 24 und 48 Stunden geimpft wurden, starben ohne Ausnahme so rasch wie die Kontrolltiere. Ich nehme auch hier an, daß die Ursache dieser Erscheinung wohl darin zu suchen sein wird, daß bei solchen Temperaturen ein Auskeimen eines Teils der Sporen nicht erfolgt und damit auch keine Abschwächung. Kulturen, die in 43—44° C gezüchtet und sich vom 2. Tage ab sicher als sporenfrei er-

1) Günther, Einführung in die Bakteriologie. p. 325.

wiesen, ließen bei Züchtung in Rinderserum eine Virulenzabschwächung nicht erkennen, denn es starben die Tiere, die damit nach 24, 48 und 72 Stunden geimpft wurden, schon nach $1\frac{1}{2}$ Tagen; bei den Kulturen, die in Bouillon gezüchtet wurden, trat dagegen eine gewisse Abschwächung zutage; es ging das Meerschweinchen, das mit einer Kultur geimpft wurde, die 48 Stunden lang in $43-44^{\circ}\text{C}$ gehalten war, erst nach 4 Tagen ein, und das mit 72 Stunden lang bebrüteter Kultur geimpfte Tier blieb am Leben.

Dieses Resultat war jedoch bei weiteren zur Kontrolle angestellten Versuchen kein stetiges. So töteten Milzbrandkulturen, in Serum bei $43-44^{\circ}\text{C}$ gezüchtet und nach 24 Stunden eingepft, in einer Versuchsreihe Mäuse 5 Tage, Meerschweinchen $1\frac{1}{2}$ Tage nach der Impfung, ein Kaninchen blieb am Leben; nach 48 Stunden geimpfte Mäuse starben nach 4 Tagen, Meerschweinchen nach $2\frac{1}{2}$ und $3\frac{1}{2}$ Tagen, ein Kaninchen nach $3\frac{1}{2}$ Tagen; nach 72 Stunden geimpfte Mäuse gingen nach 1 Tage, die Meerschweinchen nach $1\frac{1}{2}$ und $3\frac{1}{2}$ Tagen ein, eines sowie das Kaninchen blieb am Leben. Bei Versuchen mit in Bouillon bei $43-44^{\circ}\text{C}$ gezüchteten Kulturen starben die Mäuse, die mit 24 Stunden lang bebrüteten Kulturen geimpft wurden, nach 26 Stunden, Meerschweinchen nach $1\frac{1}{2}$ Tagen, ein Kaninchen nach $3\frac{1}{2}$ Tagen; nach 48 Stunden geimpfte Mäuse erlagen nach 2 Tagen, Meerschweinchen nach $1\frac{1}{2}$ Tagen, eines sowie das Kaninchen blieb am Leben; Mäuse, mit 72 Stunden lang bebrüteten Kulturen geimpft, gingen nach 1 Tag, Meerschweinchen nach $1\frac{1}{2}$, $2\frac{1}{2}$ und 4 Tagen, ein Kaninchen nach 3 Tagen ein. Zur Impfung wurde stets die gleiche Platinnadel mit Oese verwendet, so daß die Menge des verimpften Materials in jedem Versuch so ziemlich dieselbe war.

Nach diesen Versuchen zeigt der Milzbrand bei 8-tägiger Züchtung sowohl in Rinderserum wie in Bouillon bei $43-44^{\circ}\text{C}$ Mäusen und Meerschweinchen gegenüber und bei subkutaner Impfung keine deutliche Virulenzabschwächung; allerdings blieb einmal das aus Serum am 3. und das aus Bouillon am 2. Tage geimpfte Meerschweinchen am Leben; Kaninchen gegenüber läßt sich nach 2 resp. 4 Tagen eine gewisse Abschwächung nicht verkennen. Eine solche trat noch deutlicher und konstant bei länger fortgezüchteten Kulturen zutage; während Mäuse selbst 21-tägigen Kulturen noch erlagen, blieben Meerschweinchen mit 11-tägigen und Kaninchen mit 5-, 8- und 11-tägigen bei $43-44^{\circ}\text{C}$ gehaltenen Kulturen geimpft sämtlich am Leben.

Es konnten aus äußeren Gründen diese Abschwächungsversuche nicht weiter fortgesetzt werden.

III. Versuchsreihe.

Ich ging jetzt dazu über, an der Hand der aus der I. Versuchsreihe gewonnenen Ergebnisse das Verhalten der an den Fellen haftenden Milzbrandsporen zu prüfen. Meerschweinchen wurden mit Milzbrandsporen subkutan geimpft, die nach $1\frac{1}{2}$ Tagen eingegangenen Tiere abgehäutet, wobei ein Bestreichen der Felle mit Blut bei sonst möglichst aseptischem Vorgehen vorgenommen wurde. Die Häute wurden bei einer Temperatur von $26-28^{\circ}\text{C}$ in einem Glaskasten mit Luftöffnung zum Trocknen aufgehängt; um einem allzurachen Austrocknen der Felle vorzubeugen, erhielt der Glaskasten einen Bodensatz Wasser. Durch tunlichste Vermeidung von Licht und zu rascher Austrocknung sollte eine Schädigung der Milzbrandbacillen vermieden werden. Es zeigte sich in

der Folge, daß es auf den Fellen nicht überall zu Sporenbildung gekommen war, oder daß die Sporen mit der Zeit zugrunde gingen, so daß die Fellversuche in Bouillon und Wasser und später die Tierversuche öfter insofern nicht gelangen, als auch im Kontrollversuch keine Milzbrandsporen nachzuweisen waren, und mehrfache Wiederholungen teils unter Zusatz von Milzbrandsporen in Reinkultur erforderten. Die Meerschweinchenfelle wurden ca. 5 Tage dem Trocknungsprozeß überlassen. Dann wurden kleine Proben davon in Bouillon bei einer Temperatur von 43–44° C gelegt. Selbstverständlich wurden nur solche Fellpartieen verwendet, an denen vorher das Vorhandensein von Milzbrandsporen durch Impfung und Kultur nachgewiesen war.

Es erfolgte in Bouillon bei 43–44° C ein Auskeimen aller Sporen innerhalb 48 Stunden; wurden die Fellproben in Bouillon einer Temperatur von 44–45° C oder von 41–43° C ausgesetzt, so wurden dieselben sowohl nach 24 wie nach 48 Stunden nicht sporenfrei befunden. Zum Nachweis der Sporen wurden die in der Bouillon liegenden Fellstückchen zerzupft, in kleinen Glasröhrchen 5 Minuten im Wasserbad bei 80° C gehalten, das Ganze zentrifugiert und der Bodensatz Meerschweinchen und Mäusen subkutan verimpft, oder es wurden auch von den Fellproben kleinste Stücke direkt den Tieren subkutan einverleibt.

Um möglichst der Praxis in der Gerberei nahezukommen, wurden hierauf Milzbrandfelle in gewöhnliches Wasser gelegt und untersucht. Es konnte angenommen werden, daß die Felle durch das Aufweichen in Wasser so viel Nährstoffe an die sie umspülende Flüssigkeit abzugeben vermögen, daß ein Auskeimen der an den Fellen haftenden Sporen zustande kommt. Durch den Aufenthalt im Wasser 48 Stunden lang wurden die Felle gut weich, ohne ihre gute Konsistenz zu verlieren, die Haare lösten sich teils von selbst, teils gingen sie beim Anfassen in großen Büscheln ab. Es wurde bei den Versuchen den Fellen möglichst wenig Wasser zugesetzt, nur so viel, als zur völligen Umspülung derselben notwendig war, um eine möglichst konzentrierte Nährlösung zu erhalten. In der Tat ergab sich, daß nach 48 Stunden ein Auskeimen der an den Fellen haftenden und der davon durch das Wasser losgelösten freien Milzbrandsporen stattfindet; der Nachweis wurde erbracht durch Verimpfen der unter den jeweiligen Versuchsbedingungen gehaltenen Fellstückchen auf Meerschweinchen nach vorausgegangener 5 Minuten langer Erhitzung auf 80° C. Während das 24-stündige Fell den Tod des damit geimpften Tieres herbeiführte, blieb das mit 48 Stunden lang bebrütetem Fell geimpfte Tier am Leben. Auch bei diesen Versuchen ergaben sich insofern Schwierigkeiten, als die dazu verwendeten Felle, die von an Milzbrand eingegangenen Tieren herrührten und ca. 6 Wochen alt waren, öfters als sporenfrei befunden wurden. Infolgedessen wurde einige Male, um nicht von vornherein allzuviel Mißerfolge zu riskieren, den natürlichen Verhältnissen durch Aufstreichen einer Milzbrandsporensuspension auf die zur Verwendung kommenden Fellpartieen nachgeholfen. Die Resultate waren dann auch verschieden, je nachdem absichtlich eine große oder kleine Menge Sporen aufgetrocknet wurde; wurde das Fellstückchen reichlich mit Sporenmasse bestrichen, so gingen die Tiere, die später damit infiziert wurden, an Milzbrand ein, ein Beweis dafür, daß nicht alle Sporen zum Auskeimen gekommen waren, wurde dagegen spärlich Sporenmaterial aufgestrichen, so ergab das Kulturverfahren wie der Tierversuch ein Auskeimen aller Sporen innerhalb 48 Stunden; im ersteren Falle reichte offenbar der von den Fellen an das Wasser abgegebene Nährstoff

nicht aus, die gesamte große Menge der Sporen zum Auskeimen zu veranlassen. Bei den natürlich sporenhaltigen Fellen waren stets nach 48 Stunden alle Sporen ausgekeimt.

Nachdem durch solche Behandlungsmethode der Felle eine Umwandlung der Dauerformen des Milzbrandes in dessen vegetative Formen erreicht war, brauchte es nur noch einer Abtötung derselben. In Anlehnung an den Gang des Gerbereiprozesses war es das Gegebene, die Felle in Kalkmilch oder speziell in Kalkäsker zu legen, oder auch den in Wasser bei 43—44° C liegenden Fellen einfach so viel Kalkmilch zuzufügen, daß die ganze Masse deutlich alkalisch reagierte. Es ergab sich durch das Kulturverfahren wie durch den Tierversuch, daß in den Fellen und in deren Weichwässer bei 24 Stunden dauernder Einwirkung der Kalkmilch oder des Kalkäschers — eine kürzere Einwirkung wurde nicht geprüft — eine vollständige Vernichtung der ausgekeimten Milzbrandbacillen erfolgte.

Zusammenfassend ziehe ich aus diesen Versuchen folgende Schlüsse:

1) Werden Milzbrandsporen auf Nähragar, Glyzerinagar, in Bouillon oder Rinder Serum gebracht und bei einer Temperatur von 43—44° C gehalten, so keimen sie innerhalb 48 Stunden aus und bilden, bei dieser Temperatur gehalten, keine Sporen mehr.

2) Milzbrandsporenhaltige Meerschweinchenhäute 48 Stunden lang bei 43—44° C in Nährbouillon oder in so viel Wasser gehalten, daß sie überall feucht sind, lassen die Milzbrandsporen auskeimen ohne neue zu bilden, so daß ohne Schädigung der Felle die Milzbrandkeime leicht durch Kalkmilch abgetötet werden können.

3) Durch 48-stündiges Wachstum bei 43—44° C findet eine gewisse Abschwächung der Milzbrandkeime statt, deren Grad noch näher zu bestimmen ist.

4) Inwieweit dieses Verfahren in der Gerbereipraxis bei milzbrandsporenhaltigen Rindshäuten angewendet werden kann, müssen Versuche im großen lehren; dabei wird es lediglich eine Aufgabe der Technik sein, ein Schwanken der zum Gelingen des Versuches notwendigen Temperatur von genau 43—44° C zu verhüten, da sonst eine Vermehrung der Sporen stattfände, was dem erstrebten Ziel direkt entgegengesetzt wäre.

Herrn Obermedizinalrat Dr. Scheurlen sage ich für die mir zuteil gewordene Anregung und Unterstützung meinen ergebensten Dank.

Nachdruck verboten.

Blutalkaliagar, ein Elektivnährboden für Choleravibrionen.

[Aus der bakteriologischen Abteilung des Operationskurses für
Militärärzte in München.]

Von Ministerialrat Prof. A. Dieudonné, München.

Bei der bakteriologischen Choleradiagnostik wird außer dem Peptonwasser neuerdings von der Agarplatte immer mehr Gebrauch gemacht, die vor der früher fast ausschließlich verwendeten Gelatineplatte den Vorteil der raschen Keimentwicklung bei 37° bietet. Wie schon Arens¹⁾

1) Arens, Münch. med. Wochenschr. 1893. p. 190.

feststellte, liebt der Cholera-vibrio eine stark alkalische Reaktion des Nährbodens (Optimum 0,05—0,08 Proz. KOH), und in der amtlichen „Anweisung zur Bekämpfung der Cholera“ wird ein Agar empfohlen, dem nach Herstellung des Lackmusneutralpunktes auf 1 l 30 ccm einer 10-proz. Lösung von kristallisiertem kohlensauren Natron zugesetzt ist. Auf diesem stark alkalischen Agar wachsen die Cholera-vibrien sehr kräftig. Daneben entwickeln sich aber auch andere im Kot vorkommende Bakterienarten, wie das *B. coli*. Bei vielfachen Versuchen nach einem Elektivnährboden kam ich auf den Zusatz von alkalischem Blut zu Agar. Wenn man zu defibriniertem Rinderblut Normalkalilauge zu gleichen Teilen gibt, so bildet sich eine lackfarbige Blutalkalilösung, die im Dampftopf sterilisiert werden kann. Giebt man von dieser Lösung 30 Teile auf 70 Teile Nähragar, der auf gewöhnliche Weise hergestellt und auf den Lackmusneutralpunkt eingestellt ist, so wachsen darauf die Cholera-vibrien sehr üppig, während *B. coli* nicht oder nur sehr schwach gedeiht; der Zusatz von 3 Teilen Blutalkalilösung zu 7 Teilen Agar hat sich am besten bei meinen seitherigen Versuchen bewährt. Ausstriche von normalem Kot zeigten darauf keine Bakterienentwicklung, wohl aber Stuhl, der mit Cholera-vibrien (4 verschiedene Stämme) versetzt war. Dieser Agar ist also überaus stark alkalisch, wenn auch ein Teil der zugesetzten Kalilauge an das Eiweiß gebunden wird; er enthält, wie aus der Titration mit Schwefelsäure hervorgeht, etwa 0,6 Proz. freies Alkali. Da ein gewöhnlicher Agar, der 0,6 Proz. KOH enthält, keinen guten Nährboden für Cholera-vibrien darstellt, so scheint das Blutalkalalbuminat einen begünstigenden Einfluß auf die Entwicklung zu besitzen. Wie Heim¹⁾ festgestellt hat, wirkt gekochter Rinderblutkuchen oder ganzes Rinderblut, mit gleichen Teilen Wasser versetzt und anstatt Fleischwassers zur Bereitung der Nährgelatine genommen, sehr wachstumsfördernd für Cholera-vibrien. Für die Züchtung von Pneumokokken verwendet Heim²⁾ Hämoglobin, das mit Wasser und 10 Proz. Kalilauge vermischt und im Dampf sterilisiert wird; wahrscheinlich könnte statt Hämoglobin auch Blut verwendet werden.

In flüssigen Nährböden, Bouillon oder Peptonwasser, denen die Blutalkalilösung im Verhältnis von 3 : 7 zugesetzt ist, zeigt sich keine Entwicklung, wohl aber bei Vermischung zu gleichen Teilen, doch ist weder ein rascheres noch ein üppigeres Wachstum zu beobachten, so daß diese Mischung keinen Vorteil vor der gewöhnlichen Peptonkochsalzlösung besitzt. Dagegen scheint der feste Blutalkaliagar einen Vorteil vor dem gewöhnlichen alkalischen Agar zu bieten, so daß ein Versuch bei Cholera-stühlen, wozu ich keine Gelegenheit hatte, wohl zu empfehlen wäre. Der Blutalkaliagar, der im Gegensatz zu den sonstigen Alkalalbuminatnährböden sehr einfach herzustellen ist, wird in Schalen ausgegossen, die zum stärkeren Trocknen einige Tage bei 37° oder 5 Minuten auf 60° gestellt werden; das zu untersuchende Material wird mit Glasstab auf der Oberfläche verrieben. Die Agglutinierbarkeit mit Cholera-serum ist bei den auf den Blutalkaliagarplatten gewachsenen Kolonien dieselbe, wie bei den von gewöhnlichem Agar.

1) Heim, Centralbl. f. Bakt. Bd. XXX. p. 370.

2) Heim, Deutsche med. Wochenschr. 1907. p. 1587.

Nachdruck verboten.

Der Dieudonnésche Blut-Alkali-Agar.

[Aus dem Kgl. Institut für Infektionskrankheiten in Berlin (Direktor: Geh. Ober-Med.-Rat Dr. Gaffky, Abteilungsvorsteher: Prof. Dr. Lentz).]

Von Dr. **Huntemüller**, Assistenten des Instituts.

Bei meinem letzten Aufenthalt in München im September vorigen Jahres wurde mir von Herrn Prof. Dr. Dieudonné ein neuer Cholera-nährboden demonstriert, dessen Nachprüfung ich mit Genehmigung von Herrn Geh.-Rat Gaffky gern übernahm. Das Ergebnis dieser Nachprüfung kann ich kurz dahin zusammenfassen, daß der Dieudonnésche Blutalkaliagar einen großen Fortschritt in der Choleradiagnostik bedeutet. Die Entwicklung der normalen Kotbakterien wird auf ihm so gut wie gänzlich zurückgehalten, und man erhält auf der Platte, bei Anwesenheit von Vibrionen, diese in gut entwickelten Kolonien fast in Reinkultur. Das Wachstum ist dabei auf dem braunen Nährboden so typisch (große, kreisrunde, im durchfallenden Lichte glashelle, im auffallenden graue Kolonien mit glattem Rand), daß sie selbst einem wenig geübten Untersucher keine Schwierigkeiten in der Diagnose machen werden.

Ein großer Vorteil des neuen Nährbodens besteht ferner darin, daß man eine weit größere Menge von Material zu Platten verarbeiten kann, etwa das 5-fache gegenüber der bisherigen Starkagarplatte der offiziellen Anweisung zur Bekämpfung der Cholera.

Die Zubereitung des Nährbodens ist so einfach und erfordert so wenig Zutaten, daß er in jedem, auch dem kleinsten bakteriologischen Laboratorium leicht hergestellt werden kann. Das in einem sterilen Glasgefäß, in dem sich Glasperlen befinden, aufgefangene Rinderblut wird durch etwa $\frac{1}{2}$ -ständiges Schütteln defibriniert und nach Zusatz einer gleichen Menge Normal-Kalilauge eine halbe Stunde im strömenden Dampf sterilisiert. Diese Blutalkalilösung ist fast unbegrenzt haltbar und kann bei Bedarf dem neutralen Nähragar im Verhältnis von 3:7 zugesetzt werden. Die Nährlösung wird dann zu Platten ausgegossen, die eine halbe Stunde bei 60° abgetrocknet werden. Die Platten dürfen erst nach frühestens 24 Stunden in Gebrauch genommen werden. Es entwickelt sich nämlich aus der Blutlösung eine ziemlich große Menge von Ammoniak, das auch den Choleravibrio in seinem Wachstum und seiner Virulenz schädigt. Erst nach 24-stündigem Stehen bei Zimmertemperatur ist dies genügend verflüchtigt.

Auch mir standen zur Nachprüfung keine echten Cholera Stühle zur Verfügung. Doch gab die Untersuchung künstlich mit Vibrionen infizierter Stühle so günstige Resultate, daß ich, zumal in Hinsicht auf die jetzt drohende Cholera-gefahr, den Dieudonnéschen Nährboden glaube empfehlen zu können. Im hiesigen Institut findet er schon jetzt neben dem offiziellen Starkagar bei choleraverdächtigen Stühlen stets Anwendung. Da in diesen Fällen auch auf eine typhöse Erkrankung gefahndet wird, so wird das Material zunächst auf 2 Dieudonné- und darauf auf 2 Drigalski-Platten mit dem Glasspatel verrieben. Man spart so an Platten, da der erste Ausstrich auf Drigalski-Agar nur selten isolierte Kolonien ergibt und daher unbrauchbar ist.

Die Nachprüfung wurde mit verschiedenen älteren Choleravibrionen unserer Sammlung sowie mit 15 frischen Stämmen aus der vorjährigen russischen Epidemie, die teils aus Kronstadt, teils aus Kiew stammten, ausgeführt. Verschiedene Vibrionen, die ich prüfte, zeigten dasselbe Wachstum, wie echte Cholera.

Auf einem Agar, dem dieselbe Menge Kalilauge, jedoch kein Blut zugesetzt war, ließ sich das Coli-Wachstum nicht zurückdrängen, dagegen war das Wachstum der Cholera nicht so üppig, wie auf dem gleichalten Dieudonné-Agar. Die Coli-hemmenden und Vibrionenentwicklung fördernden Faktoren sind also in dem zugesetzten Blut oder der Vereinigung von Blut und Alkali zu suchen.

Setzt man dem Blut abgestufte Mengen Normal-Kalilauge zu und füllt mit sterilem Wasser auf die gleiche Menge auf, so kann man mit der Konzentration des Alkalis bis auf 4 ccm normal KOH + 11 H₂O bei 15 ccm Blut zurückgehen, eine geringere Konzentration ist nicht anwendbar, da das Blut alsdann beim Sterilisieren gerinnt. Auf den mit diesen Blutalkalilösungen in gleicher Weise, d. h. 30 Blutlösung auf 70 Agar, hergestellten Platten wuchs die Cholera in 20^h bei 70° sehr üppig, auf den mit niederem Alkaligehalt hergestellten Blutplatten wuchsen aber auch Coli und Typhus, während diese auf der Dieudonné-Platte nicht gedeihen (s. Tabelle).

Auf einem Agar, dem statt der Dieudonnéschen Blutalkalilösung neben der Normal-Kalilauge dieselbe Menge ungekochtes, steriles Blut zugesetzt war, wuchs Cholera üppig, Typhus und Coli waren nach 20^h bei 37° nicht gewachsen, erschienen aber nach 3 × 24^h in kleinen zarten Kolonien.

Auch verschiedene Stuhlproben, die die normalen Kotbakterien enthielten, zeigten dasselbe Verhalten. Aus einem Stuhl, der den *Bacillus pyocyaneus* enthielt, wuchs dieser auf allen Platten in mittelgroßen, gut umschriebenen Kolonien, jedoch ohne die ihn sonst auszeichnende Neigung, die ganze Platte zu überwuchern.

Tabelle (Wachstum 20^h bei 37°).

	Dieu- donné- agar	Agar wie Dieu- donné- agar, doch unge- kochtes Blut	Agar mit Zusatz von steri- lisiertem Blut				Agar ohne Blut doch 15 Proz. n KOH	Cholera- agar (Agar mit 0,3 Proz. Na ₂ CO ₃)
		+15 Proz. n KOH	+7,5 Proz. n KOH	+5 Proz. n KOH	+4 Proz. n KOH			
Cholera	+++	+++	+++	+++	+++	+	++	
Coli	—	—	—	+	+	++	+++	
Typhus	—	—	—	+—	+—	—	+	
Stuhl normal	—	+	+—	++	++	+	+++	
Stuhl mit Pyo- cyaneus	++	++	++	++	++	++	+++	

Zeichenerklärung: +++ üppig, ++ gut, + mäßig gut, +- zart, — kein Wachstum.

Nachdruck verboten.

Ueber eine neue Reaktion der Tuberkelbacillen und eine darauf begründete differenzialdiagnostische Färbungsmethode derselben.

[Aus dem Laboratorium des medizinisch-poliklinischen Instituts der Universität Berlin (Direktor Geh. Med.-Rat Prof. Dr. H. Senator).]

Von Dr. med. **Demetrius Gasis** (Athen).

Bei Untersuchungen auf Tuberkelbacillen im Urin mit den bis jetzt bekannten Differenzialfärbungsmethoden zeigte es sich, daß sie einerseits in vielen Fällen ein negatives Resultat ergaben, obwohl alles für das Vorhandensein einer Tuberkulose sprach, und daß andererseits anscheinend Tuberkelbacillen nachgewiesen werden konnten in Fällen, wo keine Spur von Tuberkulose vorlag.

Die Vermutung, daß vielleicht ein Fehler in der Färbung oder Entfärbung, je nach dem Färbungsverfahren, vorliegt, wodurch die Bacillen sich schlecht färben oder gar entfärben, hat mich veranlaßt, Untersuchungen anzustellen, die darauf abzielen, durch ein neues Färbungsverfahren diese Fehlerquelle auszuschließen.

Ich ging mit meiner Vermutung nicht fehl. Besonders bei dem Färbungs-, aber auch bei dem Entfärbungsakt liegen, wie weiter unten zu besprechen sein wird, die größten Fehler der verschiedenen Methoden vor.

Es gelang mir nun, eine neue Färbungseigenschaft des Tuberkelbacillus zu entdecken und darauf eine neue Färbungsmethode zu begründen, die frei ist von allen Fehlern der üblichen Methoden. Bevor ich aber zu meinen eigenen Untersuchungen übergehe, sei eine kurze Literaturübersicht vorausgeschickt.

Durch die bahnbrechenden Untersuchungen von R. Koch, dem Entdecker des Tuberkelbacillus, und später von Ehrlich u. a. ist ein eigentümliches Verhalten der Tuberkelbacillen festgestellt, wonach diese sich zwar sehr schwer färben lassen, aber, einmal gefärbt, die Farbe schwer wieder abgeben, und sie sogar gegenüber starken Entfärbungsmitteln, Säuren und Alkohol, im Gegensatz zu anderen Bakterien, behalten.

Diese Eigenschaft der Tuberkelbacillen wurde später durch die Entdeckung der sogenannten säurefesten Bakterien als nicht für die Tuberkelbacillen spezifisch nachgewiesen, so daß die Entscheidung im einzelnen Falle schwierig sein kann.

Besonders kommen hierbei für die Praxis die Smegmabacillen in Betracht (Alvarez und Tavel — Entdecker des Smegmabacillus — Arch. de physiol. norm. et pathol. 1885. No. 7) und hauptsächlich bei Urinuntersuchungen.

Zur Differenzierung der Smegmabacillen von den Tuberkelbacillen sind verschiedene Methoden angegeben worden, welche alle darauf abzielen, durch die Entfärbungsmittel, hauptsächlich anorganische und organische Säuren resp. Alkohol, eine Unterscheidung möglich zu machen (B. Fraenkel, Honsell, Bunge und Trantenroth, Weichselbaum, Alvarez u. Tavel, G. Klemperer, Hauser, Kühne, Czaplewski, A. Pappenheim).

Diese Methoden haben sich bald mehr, bald weniger bewährt, jedenfalls aber nicht in allen Fällen eine sichere Differenzierung ermöglicht, wie an anderer Stelle noch ausführlicher erörtert werden wird.

Alle bis jetzt üblichen Färbemethoden der Tuberkelbacillen benutzen basische Anilinfarbstoffe, in der Annahme, daß die basischen Anilinfarbstoffe durch eine besondere Affinität zu den Kernen resp. Bakterienzellen ausgezeichnet sind, während die sogenannten sauren Anilinfarbstoffe als diffus färbende eine solche zu dem Zellleib aufweisen. — Unsere Versuche mit sauren Anilinfarbstoffen liefern im Gegensatze dazu den Beweis, daß diese Farben auch bei geeignetem Verfahren dazu dienen können, die Bakterienleiber zu färben, und zwar in einer Weise, welche ihnen einen Vorzug vor den bisher angewandten basischen Farben verleiht.

Die auf Grund eigener, bei der Färbung der Tuberkelbacillen gewonnenen Einblicke scheinen es wahrscheinlich zu machen, daß die Färbungsintensität bei der Färbung säurefester Bacillen nur einen gewissen Grad erreichen darf, da sonst keine Differenzierung derselben möglich ist. Die färberische Differenzierung der verschiedenen Bakterien und Zellbestandteile beruht auf dem verschiedenen Elektionsvermögen der Farbe (Chromatophilie), aber auch auf dem verschiedenen Grad der Echtheit der Färbungen (Differenzierungen). — Von dieser Anschauung ausgehend, habe ich gesucht, ein Färbungsverfahren zu finden, bei dem die Färbung einen niedrigen Grad von Echtheit besitzt, gleichzeitig aber zur Differenzierung geeignet ist.

Hierzu mußte ich zu jenen Farben greifen, welche nur relativ echt zu färben vermögen, wie z. B. das Eosin.

Wir wissen, daß Eosin als saurer Farbstoff ungeeignet zur Färbung basophiler Substrate ist; wir wissen aber außerdem, daß man durch geeignete Mittel, Beizmittel, die relativ geringe Farbechtheit der Farbstoffe zu erhöhen vermag.

Die Wahl des betreffenden Beizmittels hat große Schwierigkeiten dargeboten.

Nach den bekannten Gesetzen der Farbchemie muß die Art der Beize durch den Charakter des jeweilig anzuwendenden Farbstoffes bestimmt werden; nämlich für die basischen Farbstoffe sind Säuren Entfärbungsmittel, Alkalien und ihre Salze Verstärkungsmittel, während bei sauren Farbstoffen die Farbechtheit durch saure Mittel verstärkt wird; für Salzfarben werden neutrale oder alkalische Beizungsmittel benutzt. Säuren also zu sauren Farbstoffen hinzugefügt, wirken nicht entfärbend, sondern verstärkend.

Allerdings kommen von diesem Gesetze Abweichungen vor (Ziehl, Karbolsäure zu Methylenblau, Neelsen, Karbolsäure zu Fuchsin).

Ein für mich geeignetes Beizmittel mußte folgende Grundbedingungen erfüllen:

Erstens muß es eine reine chemische Affinität zu dem darauffolgenden Entfärbungsmittel besitzen, nicht etwa wie die der Säuren zu den Farbstoffen, damit es die Stabilität der nunmehr erzielten Färbung in verschiedenem Grade, je nach der Konzentration der Lösungen, beeinflussen kann.

Zweitens muß es den Charakter eines leicht sauren Salzes tragen, ohne Säure zu sein, damit wir die Säureeinwirkung vermeiden können, welche viele Bakterienformen zu schädigen vermag.

Als Mittel, welche als Beizmittel und Entfärbungsmittel den gestellten Anforderungen genügen, habe ich nach langem Suchen das

Quecksilberchlorid resp. Kaliumjodid herausgefunden. Jenes reagiert säuerlich. Es würde durch entsprechende chemische Vorgänge die Wasserlöslichkeit des Farbstoffes herabsetzen und dadurch seine Farbfähigkeit vermehren können (Unnas Schwebefällung). Es besitzt ferner, wie bekannt, eine große Neigung, sich mit den stickstoffhaltigen Gewebsbestandteilen des Körpers an der Applikationsstelle zu verbinden, wobei eine Abtötung der Zellen und eine Ausfällung der Eiweißsubstanzen erfolgt. Es wäre möglich, daß das Quecksilberchlorid die durch die Hitze hervorgerufene physikalische Fixation des Bakterienleibes chemisch durch Koagulation und Ausfällung der albuminösen Substanzen noch erhöhen könnte (indem es mit ihnen neue chemische Verbindungen eingeht), und dadurch würde die Farbfähigkeit noch vermehrt.

Außerdem vermutete ich eine teilweise chemische Spaltung des Quecksilberchlorids und des Farbstoffes.

Wir wissen, daß das Eosin ein Kalisalz des Tetrabromfluoresceins ist. Durch Verbindung dieses Salzes mit Quecksilberchlorid käme ein zehlfacher, wenige Bromatome enthaltender Farbstoff zustande, wobei außerdem Quecksilberbromid und Kaliumchlorid entstehen; ferner könnten die frei werdenden O-Atome (aus der Wasserspaltung durch Chlor) zur Bildung einer Hydroxyl (OH)- resp. Karboxylgruppe (COOH) führen, welche Gruppe, wie bekannt, den sauren Farbstoffen durch Herabsetzung der Wasserlöslichkeit Lackbildungsvermögen verleiht und zur direkten Verankerung mit den entsprechenden (basischen) haptophoren Rezeptorgruppen des Substrates dient.

Ich ging mit meiner Vermutung nicht fehl. Es zeigte sich nämlich, daß die Einwirkung des Quecksilberchlorids auf das Eosin einen Farbstoff mit hellerer Nuance, als sie das Eosin besitzt, erzeugt; und wir wissen, daß bei den Eosinen ihre Nuance um so gelblicher ist, je weniger, um so kräftiger rot dagegen, je mehr Brom sie enthalten.

Dieses Bleichen des Farbstoffes dürfen wir hier nicht bloß auf die Oxydationsvorgänge, die sich auf O-Atome beziehen, zurückführen, sondern es ist vielmehr anzunehmen, daß neben dieser Art der Oxydation eine Ersetzung auch von einigen Br-Atomen durch Chloratome stattfindet, wie weiter unten noch zu besprechen ist.

Die von mir angestellten Versuche waren folgende: Es wurde zunächst zu 5 ccm Eosinlösung (1 g Eosin, 5 ccm absoluter Alkohol, 40 ccm Wasser) im Reagensglas eine kleine Quantität von kristallischem Quecksilberchlorid hinzugefügt, dann aufgeköcht bis zur Auflösung des Quecksilberchlorids; mit dieser warmen Mischung wurden die fixierten Präparate reichlich bedeckt und 2—3 Minuten über einer kleinen Flamme vorsichtig unter Erneuerung der verdunsteten Farblösung erhitzt, der übrige Farbstoff wurde mit Wasser abgespült, hierauf mit einer 5-proz. wäßrigen Kaliumjodidlösung übergossen bis zur Entfärbung ($\frac{1}{2}$ Minute), dann mit absolutem Alkohol und Wasser ausgewaschen und in Methylenblau nachgefärbt (Methylenblau 1,0 in 100 ccm Wasser aufgelöst).

Es kam eine sehr schöne, meine Erwartung weit übertreffende Färbung der Tuberkelbacillen zustande, welche vor allem auch die Details des Bakterienleibes erkennen ließ.

Zur Entscheidung der Frage, ob wir es wirklich mit einer Differenzierungsmethode zu tun haben oder nicht, wurde zunächst eine große Anzahl Sputa von tuberkulösen und nicht tuberkulösen Kranken untersucht.

Dabei ging ich immer in der Weise vor, daß unsere Methode durch die Ziehl-Neelsensche kontrolliert wurde.

Es ließ sich folgendes feststellen:

Bei allen Fällen, wo Tuberkelbacillen durch die Ziehl-Neelsen'sche Methode nachgewiesen worden sind, konnte ich auch bei Anwendung meiner Methode solche darstellen.

Bei der Prüfung, wie die übrigen säurefesten Bakterien, nämlich die Smegmabacillen, sich gegen meine Farbmethode verhalten, zeigte sich eine ebenso gute Färbung der Smegmabacillen wie der Tuberkelbacillen. Erstere blieben bei Anwendung verschiedener Einwirkungszeit des Entfärbungsmittels und sogar bei Ueberschreitung der üblichen Zeitdauer des Entfärbungsmittels für die Tuberkelbacillen, gefärbt.

Im mikroskopischen Präparate dieser beiden säurefesten Bakterienarten konnte ich morphologische Unterschiede nachweisen. Die Smegmabacillen sind zarte, schlanke, nicht gekrümmte, den Farbstoff gleichmäßig aufnehmende, unter sich gleichmäßig gestaltete Bakterien; die Tuberkelbacillen stellen sich als dicke und schlanke, unter sich unregelmäßig gestaltete (Pleomorphie), den Farbstoff ungleichmäßig aufnehmende Gebilde (Vakuolen-, Sporen-, Degenerationserscheinungen) dar.

Obwohl diese morphologischen mikroskopischen Unterschiede bei geübten Untersuchern die Entscheidung zwischen Tuberkelbacillen und Smegmabacillen geben können, wandte ich mich zu weiteren Versuchen, durch andere Entfärbungsmittel eine Differenzierung zu erzielen.

Ich versuchte zuerst den Alkohol resp. Salzsäurealkohol, anfangs als solchen, nachher in Lösung mit Jodkalium (Salzsäure 3 ccm, Jodkalium 2 g, Alkohol [70-proz.] 100 ccm); jedoch erwies sich dies Vorgehen als ungeeignet.

Es blieben sowohl Smegmabacillen wie Tuberkelbacillen gefärbt, auch bei Variationen in der Zeitdauer der Einwirkung des Entfärbungsmittels. Mitunter zeigte sich sogar eine größere Resistenz mancher Formen von Smegmabacillen als des Tuberkelbacillus.

Fettkörper (bei Smegmauntersuchungen) wie Kokken, welche neben der Fettmasse liegen, bleiben auch nach der Entfärbung des Präparats rot gefärbt, und verunreinigen so das Präparat.

Bei Anwendung von Essigsäure + Jodkalium zeigte sich ungefähr dasselbe Verhalten, wie bei Salpetersäure resp. Acid. citricum.

Es war also einerseits eine gewisse Labilität der Tuberkelbacillen gegenüber den angewandten anorganischen und organischen Säuren, andererseits eine Stabilität der Smegmabacillen gegenüber denselben Entfärbungsmitteln deutlich.

Gerade diese Tatsache und der Umstand, daß ich zur Färbung Eosin, also einen sauren Farbstoff, verwendete, veranlaßte mich nun, anstatt Säuren Alkalien bei der Entfärbung zu benutzen. Mit einem von ihnen gelang nun eine absolute Differenzierung der Tuberkelbacillen.

Es war dies eine Lösung von 2,0 Kaliumjodid in 100 ccm eines 50-proz. Alkohols, in der 0,5 Natriumhydrat aufgelöst ist.

Nach der Färbung mit dem schon gebeizten Eosin wurde das Präparat in Wasser abgespült, dann mit diesem Entfärbungsmittel übergossen; die sich sofort bildende weißgrüne, dicke Flüssigkeit wurde durch absoluten Alkohol abgespült und dann mit Wasser gründlich abgewaschen.

Wenn das Präparat nach der Wasserbehandlung noch rot aussah, wurde dies Verfahren wiederholt, bis das Präparat weiß mit einer ganz leicht rosa Nuance erschien.

Als Kontrastfarbe verwendete ich anfangs eine wäßrige Methylenblaulösung. Es war aber damit ein gewisser Fehler verbunden, dessen Ueberwindung einige Schwierigkeiten machte.

Da ich nämlich einerseits eine basische Farbe als Kontrastfarbe verwenden mußte, um die anderen vorhandenen Bakterien, Kokken und den Grund des Präparates zu färben, andererseits die vorangegangene Alkalisierung (durch das Entfärbungsmittel) als Beize für diese Farbe die Färbung der Tuberkelbacillen beeinträchtigen konnte, so mußte ich mich entweder direkt durch Säure gegen die Alkalisierung des Präparates schützen, oder die Farbfähigkeit des Methylenblaus durch andere Mittel herabsetzen. Es zeigte sich in der Tat, daß die Verwendung der wäßrigen Methylenblaulösung eine Nachfärbung der Tuberkelbacillen herbeiführte, so daß sie rot mit einer leichten Nuance nach Blau hin erschienen. Diese bläuliche Färbung der Bacillen konnte zu einer Täuschung und Verwechslung führen.

Ich verwendete zunächst, um diese nachträgliche Blaufärbung der Bacillen zu beseitigen, eine Lösung von Methylenblau in Alkohol (50-proz.), da, wie bekannt, der Alkohol eine gewisse Lösungskraft auf die Farbstoffe besitzt, und da ferner die Farbfähigkeit eines Farbstoffes von seinem Lösungszustand abhängig ist (je dünner, desto schwerer die Farbfähigkeit).

Die Anwendung dieser Farbstofflösung erwies sich ebenfalls als ungeeignet.

Nach mehreren Versuchen mit verschiedenen Säuren und verschiedenen Variationen derselben erzielte ich mit einer Lösung von 1 g Methylenblau in 80 ccm Wasser, zu der $\frac{1}{2}$ ccm Salzsäure und 20 ccm Alkohol abs. hinzugefügt wurde, eine ausgezeichnete Kontrastfärbung, bei der die Tuberkelbacillen gar nicht geschädigt wurden. Die Tuberkelbacillen blieben hellrot gefärbt auf blauem Grunde mit einer Nuance nach Grün hin.

Was nun die bisherigen Differenzialfärbungsmethoden der Tuberkelbacillen anlangt, so habe ich die von Honsell, Bunge und Trantenroth, Hauser sowie die von Czaplewski, Pappenheim nachgeprüft, und bin zu dem Resultat gekommen, daß die von Pappenheim, Czaplewski, sowie die von Bunge und Trantenroth sich zur Differenzierung der Tuberkelbacillen von Smegmabacillen eignen, mit dem Nachteile allerdings, daß sie manche Formen der Tuberkelbacillen so schädigen, daß sie die Farbe nicht mehr annehmen resp. behalten können. Die von Honsell sowie die von Hauser dagegen erwiesen sich als ungeeignet, da sie manche Formen von Smegmabacillen gefärbt lassen.

In diesen Untersuchungen wurden Sputa, Urin, Sekret aus dem Präputialsack junger Leute (bei ihnen findet man öfter als bei den Erwachsenen Smegmabacillen) sowie auch Kulturen von Tuberkelbacillen und Smegmabacillen verwendet. Die Smegmabacillen wurden auf Glycerinserum gezüchtet.

Bei einer weiteren Reihe von Untersuchungen zwecks Vergleichung mit meiner Methode kommen noch, speziell mit Rücksicht auf die Zahl der Tuberkelbacillen, die wichtigsten anderen Farbmethode der Tuberkelbacillen in Betracht, nämlich die von Koch-Ehrlich, Fraenkel-Gabbet, Ziehl-Neelsen, Kühne.

Zu diesem Zweck wurden möglichst identische Präparate hergestellt, nach den oben erwähnten verschiedenen Methoden gefärbt, nachgezählt,

und die Zahl der vorhandenen Bakterien mit den nach unserer Methode gefärbten Präparaten verglichen.

Die Zählung der vorhandenen Tuberkelbacillen wurde bei jedem Präparate in mehreren Gesichtsfeldern vorgenommen. Die Zahl derselben durch die der Gesichtsfelder dividiert, gab uns eine mittlere Zahl.

Das allgemeine Resultat dieser sämtlichen vergleichenden Zahluntersuchungen fiel betreffs der Brauchbarkeit zugunsten meiner Methode aus.

Es ließ sich folgendes feststellen:

1) Fast bei allen Untersuchungen konnte durch meine Methode eine höhere Zahl von Tuberkelbacillen bei der Zählung aufgefunden werden.

Manchmal war der Unterschied so groß, daß es mir keinen Zweifel darüber hinterließ, daß die Zählung auf unrichtiger Basis beruht, insofern nämlich die Unterschiede an Zahl auf technischen Fehlern des Präparates beruhen.

2) Es kamen zwei sichere Fälle von Urogenitaltuberkulose vor, die durch den Tierversuch verifiziert wurden, wo die Differenzialfarbmethode von Pappenheim, Czaplewski, sowie von Bunge und Trantenroth keine Tuberkelbacillen nachwiesen, während nach meiner Methode solche nachgewiesen werden konnten. Zwei Fälle von Lungentuberkulose (auf 120 Fälle) zeigten mit den gebräuchlichen Färbungsmethoden keine Tuberkelbacillen nach wiederholten Untersuchungen (5 Wochen hindurch), während meine Methode bei demselben fortdauernd solche nachwies.

Man kann den Vorgang durch folgende zwei Hypothesen zu erklären versuchen:

Entweder gibt es eine Form von Tuberkelbacillen, welche durch die übliche alte Methode überhaupt nicht darstellbar sind, oder diese Methoden schädigen manche Generationen des Tuberkelbacillen, so daß sie die Farbe nicht mehr behalten können und mit der darauffolgenden Kontrastfarbe sich färben.

Die erste Annahme wurde dadurch wahrscheinlich, daß ich bei einem von den oben erwähnten Fällen von Lungentuberkulose, der sowohl klinisch wie nach den Ergebnissen des Tierversuches sicher war, zunächst mit den alten Methoden keine Tuberkelbacillen fand, aber auch keine anderen blau gefärbten Bacillen sah, während mit meiner neuen Methode sich gleichzeitig Bacillen nachweisen ließen. Erst nach anderthalb Monaten gelang der Nachweis auch mit der Ziehl-Neelsenscher Methode.

Die zweite Annahme, daß es sich um eine Entfärbung mit folgender Nachfärbung der Tuberkelbacillen handelte, kann sich darauf stützen, daß ich bei der Zählung identischer Präparate, die aus einer gemischten Infektion von Larynx-tuberkulose herstammten und nach der Ziehl-Neelsenschen sowie Fraenkel-Gabbetschen und nach meiner Methode gefärbt waren, Unterschiede an Zahl der gefärbten Tuberkelbacillen, wie auch der übrigen nicht säurefesten Bacillen fanden. Während nämlich bei den Ziehl-Neelsenschen resp. Fraenkel-Gabbetschen Methoden die Zahl der säurefesten Bacillen viel kleiner die der nicht säurefesten viel größer war, überwogen im Gegensatz dazu in den nach meiner Methode gefärbten Präparaten die säurefesten Bacillen an Zahl die nicht säurefesten.

Zur Erklärung kann ich auf Angaben der Literatur zurückgehen. Seit einigen Jahren beginnen verschiedene Autoren die Säurefestigkeit der Tuberkelbacillen nicht als eine Eigenschaft aller Formen derselben

zu betrachten, was zuerst von v. Behring festgestellt und dann von anderen Autoren bestätigt wurde.

A. Marmorek fand verschiedene Färbung der Tuberkelbacillen, je nach dem Alter der Kultur. Bei gewöhnlichen sehr alten Kulturen wie bei frischen Serumkulturen finden sich in dem zarten, schleierartigen Belag bezw. dem feinen Häutchen Bacillen, die sich meist — bei der Ziehl-Kühneschen Methode — blau färben, wie gewöhnliche Bacillen. Marmorek nahm an, daß die ersteren nicht mehr imstande sind, durch ihre Lebensfunktionen die Wachs- und Fetthülle weiterzubilden, während die letzteren noch keine solche gebildet haben. W. J. Terebinski meint, daß die Tuberkelbacillen ihre Säurefestigkeit verlieren und dabei ihre Lebensfähigkeit behalten können, und daß man sie ferner durch Injizieren bei Meerschweinchen wieder säurefest erhalten kann.

Sind vielleicht diese Bacillen identisch mit einer Art von denjenigen, welche nach meiner Methode gefärbt werden?

Es spricht dafür, daß ich bei frischen bezw. sehr alten Tuberkelbacillenkulturen mit meinem Verfahren nie blau gefärbte Bacillen gesehen habe, während bei den nämlichen Kulturen die Ziehl-Neelsen-sche resp. die Fraenkel-Gabbetsche Methode solche aufwies.

Außerdem aber — und darin erblicke ich einen weiteren Unterschied und Vorteil meiner Methode von den früheren — werden durch meine Methode in tuberkulösem Sputum spezifischen Kokken ähnliche Gebilde nachgewiesen, welche die nämliche Farbreaktion, wie die Bacillen selbst, zeigen.

Much beschrieb ein nach modifizierter Gram-Methode darstellbares tuberkulöses Virus in Form von Bacillen und Granulis, und diese Form sah er als eine Entwicklungsform des Kochschen Bacillus an. Much meinte ferner in einer Reihe von experimentellen Versuchen, daß die säurefesten und nicht säurefesten Formen des Tuberkelbacillus zueinander in gegenseitiger Abhängigkeit stehen und ineinander übergeführt werden können. M. Wirths bestätigte die Angaben Muchs und konnte im Tierexperiment die Umwandlung der nach Gram färbbaren Körnchen und Stäbchen in nach Ziehl färbbare Stäbchen zeigen. Ferner hatte Wirths (Aerztlicher Verein zu Hamburg, Sitzung vom 2. Juni 1908) in zahlreichen Präparaten und Lichtbildern den Uebergang der nach Ziehl färbbaren Formen in die Muchschen Granulationen gezeigt.

Im Gegensatz dazu ist von anderer Seite die Vermutung ausgesprochen, daß es prinzipiell gar kein großer Unterschied sei, ob man diese Granulationen als Jugendformen oder Entartungsformen auffasse, da die Lebewesen bei Entartung die gleiche Stufe durchliefen, wie bei der Entwicklung (Deyke). Sind diese nach Gram färbbaren Granulationen nun mit den nach meiner Methode die nämliche Farbreaktion zeigenden Körnchen identisch?

Die Frage darf mit einem gewissen Grad von Wahrscheinlichkeit bejaht werden. Allerdings zeigen nach Gram und nach meiner Methode parallel gefärbte Präparate diese Granulationen nicht in derselben Menge, sondern nach Gram sind sie in größerer Zahl darstellbar.

Diese Körnchen, sei hier gleich bemerkt, unterscheiden sich von den Bacillen folgendermaßen: Erstens nehmen sie den Farbstoff schwerer an; das beweist der folgende Versuch: Zur exakten Färbung dieser Körnchen empfiehlt sich eine kleine Modifikation meiner Methode. Man muß nämlich eine größere Quantität von Quecksilberchlorid und Alkohol zusetzen, um auf diese Weise die Farbaufnahmefähigkeit für diese Granula

zu erhöhen. Für gewöhnlich kommt man indessen nach meiner Methode auch ohne diese Modifikation aus.

Zweitens sind sie gegen Entfärbungsmittel resistenter. Die Bacillen lassen sich durch ein Entfärbungsmittel mit 1-proz. Natriumhydrat in einer alkoholischen (50-proz.) Kaliumjodidlösung (2-proz.) entfärben, während diese Kokken sich nicht und manchmal auch nicht mit einer Lösung, die 2-proz. Natriumhydrat enthält, entfärben lassen. Bei Berücksichtigung der oben erwähnten Tatsachen läßt sich schließen, daß in dieser Hinsicht nicht nur ein gradueller Unterschied zwischen den üblichen und meiner neuen Methode, sondern auch ein prinzipieller besteht.

In bezug auf die Sonderstellung dieser Kokken kann nun jemand hier einwerfen, daß es sich vielleicht um künstliche Produkte handelt, daß nämlich durch das Färbungsverfahren die gewöhnlichen Granula der Tuberkelbacillen zerstreut und so neue Objekte dargestellt werden; das um so mehr, als diese Granula manchmal dicht nebeneinanderliegen, und das zwischen ihnen liegende Gesichtsfeld heller gefärbt ist, so daß man schwer zu entscheiden vermag, ob es sich um einzelne Objekte, oder ob es sich um künstliche Zersetzungsprodukte handelt. Gegen diese Annahme aber spricht vor allem, daß diese Granula nicht konstant sind, wie sie es, wenn es sich um künstliche Produkte handelte, sein müßten. Außerdem fand ich bei Anwendung meiner Methode keine Schädigung der Tuberkelbacillen, durch die etwa die Bildung derartiger Granula veranlaßt sein könnte.

Im Gegensatz hierzu läßt sich nicht leugnen, daß vielleicht eine Auflösung der Tuberkelbacillen und Zerstreung ihrer Granula schon im Sputum stattfindet. Dafür sprechen folgende Gründe: Erstens sind diese eigentümlichen Objekte sehr häufig bei schweren Fällen von Lungentuberkulose mit Kavernen vorhanden, also im Sputum, welches bereits in der Lunge Gelegenheit zur Putreszenz gehabt hat; und zweitens finden wir auch diese spezifischen Elemente in Sputis, welche nach der Entleerung lange stehen geblieben und gefault sind.

Erklärungsversuche für den chemischen Vorgang meiner Methode.

Will man sich nun von dem chemischen Verlauf dieses Farbprozesses Rechenschaft geben, so ist folgende Vorstellung annehmbar: Wie wirkt zunächst das Beizmittel auf den Farbstoff?

Das Brom des Eosins verläßt teilweise seine Hexangruppe und wirkt auf das Quecksilberchlorid derart ein, daß es sich mit Hg-Atomen vereinigt, und wird durch die entsprechenden Atome von Sauerstoff ersetzt, die durch die Einwirkung des frei werdenden Chlors aus dem Wasser abgespaltet werden, ferner vielleicht durch Chlor.

Das Eosin erleidet dadurch eine Metachromasie oder sogenannten Chromotropismus, indem das Metalloxyd durch Chlorierung des Farbstoffes, Entnahme des Brommoleküls und Verleihung der OH-Gruppe zur Bildung einer Farbstoffverbindung mit hellerer Nuance mit kaum nachweisbarer Fluoreszenz führt, und zugleich den Farbstoff in den Zustand der leichten Ausfällbarkeit, in Schwebefällung, versetzt.

Es handelt sich hier um eine leichte Oxydierung des Farbstoffes, durch welche der Farbstoff in eine Farbe verwandelt wird, welche eine Vorstufe der ungefärbten Leukobasen darstellt; es wirkt das Beizmittel auf den Farbstoff bleichend.

Im Gegensatz zu dieser chemischen Einwirkung des Quecksilberchlorids auf den Farbstoff können wir die mechanische Wirkung desselben nicht ganz ausschließen. Die folgende, im Reagensglas ausführbare Reaktion gab mir Anlaß zu dieser Annahme.

Bei Hinzufügung von Kochsalzkristallen zu der schon fertigen, im Reagensglas befindlichen Farbstofflösung (Eosin + Quecksilberchlorid), d. h., wenn wir das chemisch unverändert gebliebene Quecksilberchlorid in den Zustand der Löslichkeit versetzen, wird die Schwebefällung aufgehoben, die Nuance des Farbstoffes und die Fluoreszenz wird zum Teil wiedererlangt.

Es liegt also im Bereiche der Wahrscheinlichkeit, daß ein Teil des Quecksilberchlorids chemisch unverändert bleibt und seine Wirkung mechanisch auf den Farbstoff entfaltet.

Bei dem Färbeakt zeigt sich ferner die Wirkung des unveränderten Quecksilberchlorids chemisch durch Koagulation und Ausfällung der albuminösen Substanzen der Bakterienleiber. Wir haben es also hier mit einer Beize zu tun, welche wir als echte Beize bezeichnen dürfen, da die beiden Vorbedingungen der echten Beize erfüllt sind, nämlich erstens die chemische Vereinigung mit dem Farbstoff und zweitens die chemische Affinität zu den Bakteriensubstraten.

In bezug auf die bei dem Entfärbungsakt sich abspielenden Vorgänge können wir nach dem heutigen Stand der Farbchemie folgendes sagen: Was zunächst die Anwendung des Kaliumjodids betrifft, so besitzt dies eine verstärkende Wirkung bei basischen Farbstoffen, während es dagegen auf saure Farbstoffe entfärbend wirkt, indem es den Farbstoff so lockert, daß er ausgewaschen werden kann, falls nicht absolute Seifenechtheit vorliegt.

Wirkt nun das Kaliumjodid in meiner Methode so wie sonst, oder wird die Wirkung durch das Quecksilberchlorid modifiziert?

Ich glaube nicht fehlzugehen, wenn ich sage, daß die entfärbende Wirkung des Kaliumjodids auf die Wirkung des bei dem Zusammenreiben von Farbstoffgemisch + Jodkalium neuen, in statu nascendi gebildeten Körpers zurückzuführen sei, und daß das Kaliumjodid nur zur Bildung dieses Körpers und zur Entfernung des frei vorhandenen Quecksilberchlorids bei nachfolgender Abspülung dient, dagegen als solches bei der Entfärbung keine Rolle spielt. Die ausgesprochene chemische Affinität dieser beiden Körper (Quecksilberchlorid + Kaliumjodid) ist ja bekannt. Man kann sich vorstellen, daß das Kaliumjodid unter Bildung von Quecksilberjodid zur Entfernung des übrigen Quecksilberchlorids dient, und so die Auflösung des Farbstoffes (teilweise Zersetzung des Lackes, Aufhebung der Schwebefällung) verursacht.

Dieselbe Reaktion kann man im Reagensglas ausführen. Bei Hinzufügung von Kaliumjodid zu dem schon gebeizten, im Reagensglas befindlichen Farbstoff bekommt man gleich nach der Auflösung des Kaliumjodids eine ganz helle, weißrote Lösung (Vorstufe der Leukobasen), die sich in starker Schwebefällung befindet und dann bei längerer Aufbewahrung (1–2 Minuten) eine tiefrote Farbe annimmt und sich ganz auflöst.

Wie kommt es nun, daß bei längerer Aufbewahrung die Lösung wieder die rote Farbe annimmt und sich ganz auflöst? Es kann vielleicht so sein, daß durch die weitere Wirkung des Quecksilberjodids die Leukobase bei Bildung von Merkurial- resp. Bromsalzen und durch Annahme von Jod sich in Jodfluorescein umwandelt. Dafür spricht, daß die neue Farblösung bläulich-rot ist und nicht fluoresziert, wie die ur-

sprünglichen Bromeosine. Diese weitere Wirkung des Quecksilberjodids mußten wir vermeiden, um die Differenzierung fest zu behalten. Wir mußten nämlich diese Wirkung in dem Moment ausschalten, in dem der Lack zerstört ist, also in dem Moment der Bleichung des Farbstoffes, und bevor die Bildung des Jodeosins anfang, welche nachträglich Wiederfärbung des Präparates verursachen könnte. Wir haben anfangs, um diese weitere Wirkung zu vermeiden, absoluten Alkohol allein oder in Verbindung mit Säuren (Salzsäurealkohol) wie auch Säuren zu verwenden versucht.

Die Einwirkung des Alkohols hatte keinen Effekt; nur als gutes Abspülmittel konnte er betrachtet werden. Die Einwirkung von Alkohol in Verbindung mit Säuren (Salzsäure-Alkohol 3-proz.), wie auch von Säuren allein (Acidum nitricum, Milchsäure, Zitronensäure, Essigsäure) unterstützte die entfärbende Wirkung des Jods lediglich in bezug auf die Entfärbung der übrigen Bestandteile, dagegen blieben die Smegmabacillen gefärbt. Es zeigte sich sogar, wie oben erwähnt, manchmal eine größere Resistenz der Smegmabacillen gegen Säuren, als der Tuberkelbacillen. Das ist ein Beweis, wenigstens bei meiner Methode, daß die Anwendung der organischen Säuren zur Entfärbung der Smegmabacillen nicht geeignet ist. Die Besichtigung des mikroskopischen Bildes (ganz abgeblaßte Stäbchen) und die parallelen numerischen Untersuchungen mit anderen Farbmethode zeigen ferner, daß bei der Entfärbung mit Säuren eine Auflösung der Tuberkelbacillen zustande kommt, daß nämlich einige Generationen der Tuberkelbacillen sich gegen Säuren, mögen es noch so dünne Lösungen sein, ganz labil verhalten haben.

Die Anwendung des Eosins, also eines sauren Farbstoffes, brachte mich, wie schon erwähnt, auf den Gedanken, anstatt Säuren Alkalien bei der Entfärbung mit Jodkalium zu verwenden.

Weiterhin zeigte sich bei Versuchen im Reagensglase, daß bei Hinzufügung von Alkalien die Bleichung des Farbstoffes durch Jodkaliumalkohol nicht über die rote Farbe hinausging, sondern bis zur Bildung einer gelbgrünen mit einer ganz leichten Rosanance mit starker Fluoreszenz führte und in diesem letzteren Zustand blieb.

Unter den Alkalien habe ich anfangs das Ammoniumkarbonat versucht, in der Annahme, daß es sich mit dem schon durch die Einwirkung des Kaliumjodids gebildeten Quecksilberjodid verbinden würde, indem es einen Niederschlag von Merkuriammoniumjodid ($\text{Hg}_2\text{NJ} + \text{H}_2\text{O}$) bildete, und so die Wirkung des Quecksilberjodids verhinderte.

Die Wirkung war meiner Annahme entsprechend (Kaliumjodid 1 g Alkohol 100 ccm [70-proz.], Ammoniumkarbonat 10 g). Da aber das Ammoniumkarbonat eine flüchtige Substanz ist, waren die Resultate meiner Untersuchungen nicht immer die gleichen; während ich nämlich anfangs, also in der Zeit, wo die Lösung noch frisch und unverändert war, die Tuberkelbacillen von den Smegmabacillen differenzieren konnte, erlaubte die Veränderung dieser Lösung später, auch bei kurzer Aufbewahrung, keine Differenzierung mehr.

Ich ersetzte dann dieses alkalische Entfärbungsmittel durch Natriumhydrat und versuchte dasselbe in verschiedenen Konzentrationen.

Es gelang mir, bei einer 0,5-proz. Konzentration, wie schon erwähnt, die entfärbende Wirkung des Kaliumjodids zu unterstützen und außerdem ferner alkalisch zerstörend einwirken zu lassen, indem ich zugleich die Differenzierung der Tuberkelbacillen habe erzielen können, ohne irgendeine Schädigung derselben zu verursachen.

Die Wirkung dieses alkalischen Mittels fasse ich nicht bloß als ein die Entfärbungskraft des Kaliumjodids unterstützende, insofern es nämlich die weitere Umwandlung der schon zum Teil gebildeten Leukobasen durch Jodapposition in neue Farbbasen verhindert, sondern auch als ein als Alkali selbst die sauren Farbstoffe weiter entfärbendes Mittel auf.

Bei der Entfärbung mit Jodkalium wird der Farbstoff nämlich nicht bis zur gänzlichen Leukobase umgewandelt; in dem Moment der Bleichung, und bevor die rote Farbe eintritt, ist die Farbe der Lösung weißrot, was zeigt, daß die Bleichung, also die Umwandlung in Leukobase, nicht ganz vollzogen ist; es scheint die Annahme möglich, daß doch noch etwas von Jod oder von Chlor mit den entsprechenden O-Atomen übrig und verbunden mit der Leukobase bleibt.

Durch die Wirkung des Alkali erreicht die Lösung eine weitere Stufe der Leukobasen.

Das heißt also, daß das Alkali eine weitere zerstörende Wirkung auf den Lack besitzt.

Die Wirkung des Kaliumjodids darf hier nur auf Reduktion zurückgeführt werden, da ich, wie weiter unten zu ersehen ist, durch Oxydationsmittel diese farblosen Leukoprodukte in Farbbasen wieder umwandeln konnte.

Diese Reduktion bezieht sich nicht nur auf die Entziehung des durch das Quecksilberchlorid dem Farbstoff verliehenen Chlors, sondern auf wirkliche Reduktion, also auf Zufügung von Wasserstoff. Die reduzierende Kraft des Jodkaliums wird weiter durch die Alkalizufügung vollzogen. Das Alkali bewirkt die gänzliche Entziehung des Chlors und zum Teil der O-Atome und die Einführung von H-Atomen, so daß der Farbstoff in ein farbloses Leukoprodukt, das Fluorescein, umgewandelt wird.

Die im Reagensglase angeführten Versuche zeigten, daß diese Erklärung des Vorganges als richtig angenommen werden darf. Zu dem schon fertigen, im Reagensglase befindlichen Farbstoff fügte ich langsam und unter Umschütteln so viel von dem Entfärbungsmittel (1 g Kaliumjodid, 0,5 Natriumhydrat, 100 ccm Alkohol [50-proz.]) hinzu, bis die Lösung eine prachtvolle gelbgrüne, intensive Fluoreszenz annahm, welche für die alkalische Lösung des Resorcinphthaleins oder Fluoresceins charakteristisch ist. Die Hinzufügung von kleinen Quantitäten flüssigen Broms, was selbstverständlich mit den entsprechenden O-Atomen in die chemische Verbindung eintritt, in diese Lösung förderte einen roten Farbstoff mit grüner Fluoreszenz zutage, was, wie bekannt, für die Brom-eosine charakteristisch ist. Das heißt also, daß dieses Leukoprodukt durch Oxydation und Bromverleihung sich in Farbbasen umwandeln läßt.

Die Nuance dieses Farbstoffes wurde um so gelblicher, je weniger, um so kräftiger rot, je mehr Brom ihm hinzugefügt wurde.

Daß diese Wirkung der Alkalien nicht die nämliche mit der bei Verwendung von Säuren bei der Entfärbung ist, zeigten die folgenden Versuche:

Anstatt des oben erwähnten Alkali enthaltenden Entfärbungsmittels fügte ich zu dem Farbstoff von einem Säure enthaltenden Entfärbungsmittel (Salzsäurealkohol + Jodkalium) so viel hinzu, bis der Farbstoff auch seine rote Farbe verlor, und eine grüne annahm, aber hier nicht mit einer Fluoreszenz, wie bei dem mit Alkalien. Wenn man jetzt Brom der Lösung hinzufügt, so tritt keine rote Farbe auf. Das beweist, daß die Zerstörung des Farbstoffes durch Säuren so weit fortschreitet, bis

eine Wiederherstellung durch geeignete Mittel nicht mehr zustande kommen kann.

Bei Berücksichtigung dieser Gesichtspunkte ergibt sich die Schlußfolgerung:

Neben den schon lange festgestellten Eigenschaften des Tuberkelbacillus, der Säure- resp. Alkoholfestigkeit, gibt es, wie meine Untersuchungen gezeigt haben, eine neue Reaktion der Tuberkelbacillen, die Alkalifestigkeit, und diese ist die wichtigste und alleinige spezifische Eigenschaft der Tuberkelbacillen, die bei allen Formen derselben, Jugend- resp. degenerierten Formen, konstant ist. Im Gegensatz dazu ist die Alkohol- resp. Säurefestigkeit, die schon als spezifische Eigenschaft der Tuberkelbacillen beschrieben wurde, nur bei einigen von ihnen vorhanden und ferner auch bei anderen pathogenen und nicht pathogenen Bakterien nachzuweisen.

Ueber die spezifische Färbbarkeit der Tuberkelbacillen bei meiner Methode.

Man schrieb anfangs das spezifische Verhalten der Tuberkelbacillen gegen Farbstoffe nach Ehrlich einer die Bacillen umgebenden Hülle zu, und nahm an, daß diese Hülle durch Alkali für Farben aufnahmefähig wird, dagegen für entfärbende Mineralsäuren undurchdringlich ist. Diese Hypothese wurde aber später durch die Ziehlsche Methode als unrichtig erwiesen.

Man suchte dann durch die Fettsubstanzen des Bacillus dieses eigentümliche Verhalten zu erklären; Bienstock und Gottstein haben nämlich beweisen können, daß auch andere nicht säurefeste Bakterienarten durch Behandlung mit Fetten säurefest werden. Außerdem verleiht die Züchtung mancher Bakterien auf fettreichen Nährboden denselben eine gewisse Säurefestigkeit (Bienstock, Gottstein, Grigorjew) bzw. Alkoholresistenz (Weber). Ferner fand Gottstein, daß durch 10 Minuten lange Einwirkung von heißer, 2—5-proz. alkoholischer Kalilauge den so behandelten Bakterien die spezifische Farbeigenschaft entzogen werden kann, während die Tuberkelbacillen bei derselben Prozedur ihre Säurefestigkeit nicht verlieren.

Die Annahme fett- und wachsartiger Körper in der Hülle der Tuberkelbacillen, welche die Widerstandsfähigkeit verleihen, wurde fernerhin dadurch bestätigt, daß nach Klebs nach Extraktion dieser Substanzen mit Aether die Tuberkelbacillen ihre Säurefestigkeit verlieren. Weyl konnte durch Behandlung mit NaOH den säurefesten Bestandteil der Bacillen isolieren. C. Helbing machte dagegen für die Säurefestigkeit des Tuberkelbacillus nicht die Fettsubstanzen, sondern Chitinkörper verantwortlich. Erstens, weil das Chitin dieselbe Reaktion gebe, und zweitens, weil ein sehr großer Teil der Tuberkelbacillen aus Chitin bestehe. Neuerdings sucht André Philibert die Ursache der Säurefestigkeit nicht in den Fett- und Wachskörpern, sondern in der physikalischen Zusammensetzung des Bakterienleibes.

Wie wir also sehen, gilt, außer diesem Einwande, bis jetzt die Annahme, daß die Tuberkelbacillen ihre Säureresistenz den fett- resp. wachsartigen Substanzen verdanken.

Die bei meiner Farbmethode sich abspielenden chemischen Vorgänge sprechen indessen nicht für diese Anschauung. Es wäre ja nicht einzu-

sehen, warum bei meiner Methode nach dieser kräftigen Alkaliprozedur, welche die Fettwand der Bacillen vernichten resp. verseifen würde, der Farbstoff noch in den Bakterienleibern zurückbleiben sollte, wenn die Farbfestigkeit der Bakterien den Fett- und Wachskörpern zu verdanken wäre.

Es wär vielmehr anzunehmen, daß für die Alkalifestigkeit bei meiner Methode solche Substanzen verantwortlich sind, welche den Eiweißsubstanzen ähnlich sind.

Dafür sprechen folgende Gründe:

Bei Versuchen, ein dauerhaftes, stabiles Farbstoffgemisch herzustellen (wie weiter unten zu ersehen ist, muß der Farbstoff immer frisch zubereitet werden), erhob ich einen merkwürdigen und ganz unerwarteten Befund, welcher vielleicht zur Aufklärung dieser Tatsache dienen kann.

Es wurde nämlich der schon in Schwebefällung befindlichen Eosinlösung (Eosin + Quecksilberchlorid) so viel Alkohol hinzugefügt, bis die Lösung wieder zum Teil klar wurde und die fluoreszierende rote Farbe teilweise auch aufgenommen hatte.

Mit diesem Farbstoffe wurde ein tuberkelbacillenhaltiges Präparat wie üblich gefärbt.

Die Besichtigung des Präparates zeigte den merkwürdigen Befund, daß außer den Tuberkelbacillen, deren Zahl, wie hier gleich bemerkt sei, sehr vermindert war, auch die eosinophilen Granula der vorhandenen Leukocyten gefärbt blieben. Außerdem erschienen einige Tuberkelbacillen ganz entfärbt mit einer schwarz gefärbten Hülle.

Die Tatsache, daß diese beiden Elemente, die Tuberkelbacillen und die eosinophilen Granula der Leukocyten, dieselbe Farbreaktion geben, legte die Vermutung nahe, daß die Bestandteile dieser beiden differenten Körper chemisch verwandt sind, wenigstens nach einer Richtung hin, dem färberischen Verhalten. In bezug auf die chemische Beschaffenheit der eosinophilen Körnung sind wir leider nicht ganz sicher unterrichtet. Man kann aber so viel sagen, daß dieselbe aller Wahrscheinlichkeit nach aus Eiweißsubstanzen besteht. Sacharoff sprach die Meinung aus, daß die Entstehung der eosinophilen Granulation ein Phänomen der Phagocytose darstellt, so daß die eosinophilen Körnchen der Leukocyten aus Bruchstückchen der roten Blutkörperchen bestehen. Die chemische Natur dieser Granula ist, wie Sacharoff angibt, Paranuklein für die runde Granulation und degeneriertes Nuklein für die stäbchenförmige Granulation. St. Klein, Freiberg und Hermesen geben an, daß die eosinophile Körnung aus Hämoglobin besteht. Barker fand in der eosinophilen Granulation Eisen, während in der neutrophilen kein solches nachgewiesen werden konnte. Wir wissen außerdem aus der Chemie des Tuberkelbacillus, daß er außer dem Gehalt an Fett, Kohlehydraten, mineralischen Bestandteilen usw. auch Eiweißkörper resp. Proteine enthält.

Koch konnte durch Trocknen von Kulturen, feinste Zerreibung, Ausschütteln mit Wasser und Zentrifugieren ein Bacillenverreibungsextrakt herstellen. In diesem Bacillenverreibungsextrakt wurde außer genuinen Eiweißkörpern und primären Albumosen auch ein Nuklein nachgewiesen (durch Essigsäure eine 4 Proz. Phosphor enthaltende Fällung, welche weder die Millonsche noch Xanthoproteinreaktion, sondern nur die Biuretreaktion gab).

Es ist also eine Tatsache, daß diese beide Elemente, eosinophile Granula und Typhusbacillus, dieselbe chemisch nachweisbare Substanz enthalten.

Diese Tatsache nun, erstens, daß bei der Entfärbung solche Mittel angewandt worden sind, welche die Hülle der Bacillen schädigen und so die Färbbarkeit derselben beeinträchtigen konnten; zweitens, daß dieselbe Farbreaktion weder fett- noch wachsartige Körper, sondern nur nukleinhaltige Körper zeigen, und daß ein Teil des Tuberkelbacillenleibes aus Nuklein besteht; und außerdem, daß eine Form von Tuberkelbacillen, die Granulaform, bei welcher gar keine Wachshülle nachzuweisen ist, und welche nicht säurefest ist, färberisch in derselben Weise reagiert; diese Tatsachen also sprechen dafür, das eigentümliche Verhalten der Tuberkelbacillen gegen Alkalien nicht dem Vorhandensein von fett- bzw. wachsartigen Körpern zuzuschreiben, sondern es auf die oben erwähnten Proteinstoffe, speziell das Nuklein, zu beziehen.

Studien über die Struktur der nach meiner Methode gefärbten Bacillen.

In jedem Trockenpräparate und bei jeder Färbung erleidet der Tuberkelbacillus Strukturveränderungen, die aber nicht zu vermeiden sind. Die Deutung derselben ist von vornherein dadurch erschwert, daß der Tuberkelbacillus ungefärbt sich überhaupt sehr schwer erkennen läßt und die feineren Details seiner Struktur nur bei Färbung desselben zu beobachten sind.

Bei der eingreifenden Behandlung der Präparate mit Säuren scheinen diese Strukturveränderungen am meisten in Erscheinung zu treten.

Außerdem gestattet auch die tinktorielle Kraft der basischen Anilinfarbstoffe, welche bei den verschiedenen Methoden der Tuberkelbacillenfärbung in Anwendung gebracht worden sind, nicht, in der totalen Färbung des Bakterienleibes feinere Details der Struktur zu erkennen. Da bei meiner Methode erstens die schädigende Wirkung der Säuren ausgeschaltet ist, und zweitens die Tinktionskraft des Farbstoffes geringer ist, als bei den basischen Farbstoffen, so treten feine Differenzen des Bakterienleibes zutage, welche bei den übrigen Methoden sich der Betrachtung entziehen.

Meine Farbmethode bringt Bakterien zu Gesicht, die nach Größe und Dicke verschieden sind (Pleomorphie): Kleine Stäbchen und große, welche die ersteren um das 3—4-fache übertreffen. In bezug auf die Dicke sind ebenfalls Unterschiede vorhanden. Die Differenzen sind aber nicht so erheblich, wie bei der Größe.

Im allgemeinen sind die langen Formen auch die breiten, die kurzen die schlanken; indessen kommen davon Abweichungen vor. Die kleinen und schlanken Formen sind meistens gerade, mit abgespitzten Enden, und nicht säurefest, oder nach der Ziehlschen Methode nur partiell säurefest. Sporoiden Gebilde sieht man in ihrem Leibe nicht, sie erscheinen ganz homogen.

Die kleinen dicken Stäbchen stellen sich als plumpe oder ovale Gebilde dar, deren Protoplasma auch homogen erscheint. Solche sieht man bei Anwendung der Ziehlschen Methode sehr selten, während dieselbe bei meiner Färbung öfters in Erscheinung treten.

Die großen Bacillen weisen eine ganz eigentümliche Struktur bei meiner Methode auf; erstens färbt sich die Hülle intensiv rot, das Protoplasma des Bakteriums hellrot. Bei feiner Einstellung bekommt man einmal die Hülle intensiv rot zu sehen, und das Innere des Bakteriums hellrot, und das andere Mal besser das Innere des Bakteriums zu sehen, während die Hülle kaum zu erkennen ist. Es scheint, als ob die Hülle

dicker als das Protoplasma sei; die Bacillen sind also als längliche Stäbchen mit einer Einziehung in der Mitte aufzufassen.

Zweitens weist der Sitz resp. die Zahl der Sporen eine Eigentümlichkeit gegenüber den übrigen alkalifesten Bakterien auf. Die Sporen sitzen nämlich in der Mitte des Bakteriums, in ungleichmäßigen Zwischenräumen manchmal 2 dicht aneinander liegend, manchmal wieder in ganz gut erkennbaren Zwischenräumen; die Zahl derselben beläuft sich auf 3—4. Wenn sie in der ganzen Länge des Bakteriums liegen — und das ist öfters der Fall, dann können sie bis 6—8 betragen — und sitzen dann in gleichmäßiger Entfernung voneinander.

Diese Sporen erscheinen als kleine, kugelförmige, lichtbrechende Lücken, welche bei Verwendung von wässerigem Methylenblau zur Kontrastfärbung sich intensiv blau färben, bei rot gebliebenem Protoplasma. Die Krümmung ist bei fast allen nachweisbar, manchmal unter stumpfem Winkel, so daß man beim ersten Blick meint, es mit 2 Bacillen zu tun zu haben; bei näherer Betrachtung sieht man aber, daß es nicht der Fall ist.

Zwischen diesen beiden Formen des Tuberkelbacillus, den kleinsten und größten, deren erstere wir als Entwicklungsstadium auffassen wollen, während letztere die reife Form darstellt, liegt eine mittlere Form der Tuberkelbacillen.

Sie weist manchmal besondere Eigentümlichkeiten auf, welche man bei den beiden erwähnten Arten nicht findet. Man sieht nämlich solche Bacillen, deren Protoplasma ganz homogen erscheint, wie bei der kleinsten Art, die keine Andeutung einer Differenzierung ergibt, die Hülle aber fängt an, sich von dem Inneren des Bakteriums zu unterscheiden, läßt sich stärker tingieren, während das Innere schwach rot bleibt; und andere, welche außer diesem Unterschied noch deutliche Unterschiede in der Homogenität erkennen lassen, die man in ihrem Fortschreiten je nach dem Entwicklungsstadiums der Bakterien bis zur Sporenbildung verfolgen kann.

Die Zahl der Sporen ist verschieden, manchmal 2, ein andermal 3 oder 4—5. Ihr Sitz ist gewöhnlich in der ganzen Länge des Bakterienleibes in gleichmäßiger Entfernung voneinander. Diese letztere Form scheint die ältere zu sein, da sie sich der größten Form mehr nähert. Diese Bacillen sind stark säurefest, besonders die, welche ganz gut erkennbare Sporenbildung haben.

Die Hüllenbildung kann man bei Kulturen verschiedenen Alters mit meiner Färbung sehr gut verfolgen. Man begegnet z. B. Tuberkelbacillen, welche stückweise die Hülle besitzen; dieses Stückchen liegt anfangs immer an der Mitte des Bakteriums, und wächst immer weiter nach den beiden Enden des Bakteriums zu, bis es den ganzen Bacillus umhüllt.

Selten kommt eine Art vor, bei welcher keine Hülle zu unterscheiden ist, während an beiden Polen des Bakteriums Sporen liegen; diese Sporen lassen sich mit dem Salzsäurealkohol + Methylenblau auch intensiv tingieren. Dieser Eigentümlichkeit der Sporenbildung begegnen wir nicht bei der größten Form.

Außerdem aber gibt es Bakterien, deren Strukturunterschiede keine Regel aufweisen, und welche nicht in eine der oben erwähnten 3 Klassen zu klassifizieren sind. Namentlich solche große, mit stückweise gefärbter Hülle, andere, auch große, deren Sporenhalt nicht ganz zu erkennen ist, und die manchmal homogen erscheinen.

Endlich kleine, welche eine zum Teil verhaltene Hülle aufweisen;

diese Form unterscheidet sich von der kleinen Form, welche die Hülle noch nicht ganz entwickelt haben, dadurch, daß sie auch Sporen besitzen, und daß öfters in der Mitte des Bakteriums die Hülle fehlt, während bei den Jugendformen, bei denen die Hülle noch nicht ganz ausgewachsen ist, das Wachstum der Hülle anfangs in der Mitte des Bakteriums beginnt. Andere Male liegen 2—3 Bakterien dicht aneinander, in kurze Bröckchen zerfallen, so daß die Unterscheidung einzelner schwer ist. Alle diese letzteren Formen der Tuberkelbacillen müssen zweifellos als Degenerationsprodukte aufgefaßt werden.

Zweigung der Tuberkelbacillen habe ich nie gesehen.

Die Granulaform erscheint immer in Massen von 5—6 dicht nebeneinanderliegenden Körnchen, manchmal neben 2—3 ganz gut erhaltenen Bacillen. Das zwischen ihnen liegende Gesichtsfeld bleibt auch hellrot gefärbt. Manchmal zeigt sich eine große, rot gefärbte Masse, deren nähere Betrachtung stärker tingierte Pünktchen erkennen läßt, so daß man von Degenerationsprodukten, beginnender Auslösung, sprechen kann.

Die öfters im Sputum auftretende Form ist die mittlere und die kleine Form.

Die lange Form ist selten, und wenn sie vorhanden ist, dann kommt sie mit den beiden anderen zusammen vor. Die Granulaform ist sehr selten.

Beschreibung der Methode.

1) Vorbereitung des Farbstoffes mit der Beize. Einige Kubikzentimeter (5 ccm) einer 1-proz. Eosinlösung (1 g krist. Eosin, 5 ccm abs. Alkohol, 95 ccm dest. Wasser) werden mit einem ungefähr linsengroßen Stück Quecksilberchlorid im Reagensglas langsam unter Umschütteln gekocht, bis das Quecksilberchlorid sich ganz auflöst. Der Farbstoff nimmt dann eine hellere Nuance an und setzt sich in Schwebefällung.

2) Das fixierte Ausstrichpräparat wird 1—2 Minuten lang mit warmer Farblösung bedeckt.

3) Dann in Wasser abgespült und mit dem Entfärbungsmittel übergossen [0,5 Natriumhydrat, 1,0 Kaliumjodid, 100 (50-proz.) Alkohol], bis die rote Farbe verschwunden ist, und eine weißgrüne Farbe auftritt.

4) Entfernung des Entfärbungsmittels durch absoluten Alkohol. Gründliche Wasserabspülung.

5) Kontrastfärbung mit Methylenblaulösung (1,0 g krist. Methylenblau, 10 ccm abs. Alkohol, $\frac{1}{2}$ ccm Salzsäure, 90 ccm dest. Wasser) auf 2 bis 3 Sekunden.

Gründliche Wasserspülung, Trocknen in leichter Flamme, Einbetten.

Sollte nach der Wasserbehandlung das Präparat noch rot erscheinen, dann wird dieselbe Prozedur wiederholt (Entfärbungsmittel, Alkohol, Wasser), bis das Präparat entfärbt wird.

In bezug auf die Beizung des Farbstoffes und die Farbfähigkeit desselben sei hier gestattet, einige Bemerkungen einzuschalten. Durch progressive Hinzufügung von Quecksilberchlorid tritt eine Verstärkung der Färbbarkeit bis zu einem gewissen Punkte ein, dann bei weiterem Zusatz wieder Schwächung bis zum totalen Verlust derselben.

Außerdem wird bei Benutzung höherer als 1-proz. konzentrierten Eosinlösungen (höchstens 2-proz.), wie auch bei Hinzufügung größerer Quantitäten als 5 ccm von Alkohol die Färbung insofern beeinflusst, als dann die Bakterien nur wenig von der Farbe annehmen, und sich in dem Präparate Farbstoffniederschläge und Kristalle bilden, welche das

Präparat verunreinigen, ohne jedoch dasselbe ganz unbrauchbar zu machen. Dasselbe gilt auch bei lang dauernder Erhitzung des mit dem Farbstoffe übergossenen Präparates und bei längerem Stehenlassen des mit dem Farbstoffe gemischten Präparates.

Ist die Färbung gelungen, so ist das Bild äußerst rein und schön: Die Bakterien erscheinen hellrot, das übrige blau.

Nachteile.

Es darf nicht verschwiegen werden, daß die Methode nicht ganz frei von Nachteilen ist.

Die Farbstofflösung setzt in den ersten Stunden nach ihrer Bereitung Farbstoffniederschläge ab. Der Farbstoff setzt sich als schmieriger Belag auf den Boden und an die Wand des Reagensglases ab, wird so unbrauchbar und muß dann durch neuen ersetzt werden.

Außerdem ist es besonders wichtig, das Präparat nur ganz dünn aufzustreichen, da man sonst die Entfärbung auch so weit treiben muß, bis einige Bacillen entfärbt werden, und das angestrichene Material wegen der starken Alkalisierung des Präparates zum Teil abgespült wird.

Diese Nachteile fallen aber gegenüber den erheblichen Vorteilen der Methode, unter denen ich für wissenschaftliche Zwecke außer den für die Praxis bereits hervorgehobenen, noch besonders die feineren Differenzierungen der Struktur der Bakterien nennen möchte, nicht ins Gewicht.

Zusammenfassung.

Die Tuberkelbacillen verhalten sich amphoter gegen Säuren und Alkalien.

Die Smegmabacillen sind zum Teil säure- resp. alkoholfest.

Die Smegmabacillen sind nicht alkalifast.

Die Tuberkelbacillen sind zum Teil säure- resp. alkoholfest.

Die Tuberkelbacillen sind sämtlich alkalifast.

Die neue Reaktion der Tuberkelbacillen (Alkalifastigkeit) ist nicht der Wachshülle derselben zuzuschreiben, sondern wahrscheinlich auf die darin enthaltenen proteinhaltigen Substanzen, vielleicht die Nukleine zurückzuführen.

Es läßt sich eine Form von Tuberkelbacillen mit meiner Methode nachweisen, welche mit den bisherigen Methoden nicht nachgewiesen werden konnte.

Literatur.

- 1) Koch, R., Verhandl. d. Congr. f. inn. Med. Wiesbaden (Bergmann) 1882. Bd. I. p. 56.
- —, Berl. klin. Wochenschr. Bd. XIX. 1882. p. 221.
- —, Mitteilungen a. d. Kais. Gesundheitsamte. 2. 1. Berlin 1884
- 2) Ehrlich, Deutsche med. Wochenschr. 1882. p. 270.
- —, Charité-Ann. 1886.
- 3) Ziehl, Deutsche med. Wochenschr. 1882. p. 451.
- 4) Neelsen, Fortschr. d. Medizin. 1885. p. 200.
- 5) Fraenkel, B., Berl. klin. Wochenschr. 1884. p. 194 u. 214.
- 6) Alvarez et Tavel, Arch. de physiol. norm. et pathol. 1885. No. 7.
- 7) Honsell, Arb. a. d. Pathol. Inst. zu Tübingen. Herausgeg. von Baumgarten. Bd. II. 1886. p. 317.
- 5) Fraenkel, A., Berl. klin. Wochenschr. 1898. p. 246. 880.
- 9) Cima, Arch. ital. d. Otol. Vol. IX. 1900. p. 72.

- 10) Bunge u. Trautenroth, Fortschr. d. Med. Bd. XIV. 1896.
- 11) Weigert, Virchow Arch. Bd. LXXXIV. 1881. p. 275.
— —, Deutsche med. Wochenschr. 1885. p. 599.
- 12) Günther, Einführung in das Studium der Bakteriologie. 1906. p. 157—163.
- 13) Weichselbaum, Wien. med. Wochenschr. 1884.
- 14) Klemperer, G., Deutsche med. Wochenschr. 1885. p. 809.
- 15) Hauser, Compt. soc. biol. 1898.
- 16) Kühne, Praktische Anleitung zum mikroskopischen Nachweis von Bakterien. Leipzig 1888.
- 17) Czaplewski, Die Untersuchung des Auswurfes auf Tuberkelbacillen. Jena 1891.
- 18) Pappenheim, A., Berl. klin. Wochenschr. 1898. No. 37.
— —, Grundriß der Farbchemie. Berlin 1901.
- 19) Grethe, Fortschr. d. Med. 1896. No. 9.
- 20) v. Behring, Beitr. z. Klin. d. Tuberkulose. Bd. VIII. Heft 1 u. 4.
- 21) Marmorek, A., Zeitschr. f. Tuberk. u. Heilst. Bd. I. p. 444.
- 22) Terebinski, W. J., Ann. de dermatol. et de syphiligraphie. Août-Septembre. 1908.
- 23) Much, Beitr. z. Klin. d. Tuberkulose. Bd. VIII. Heft 1.
— —, Berl. klin. Wochenschr. 1908. No. 14.
- 24) Wirths, M., Aerzte-Verein zu Hamburg. Sitzung vom 2. Juni 1908. Berl. klin. Wochenschr. 1908.
- 25) Bienstock, Fortschr. d. Med. 1886. p. 193.
- 26) Gottstein, A., Fortschr. d. Med. 1886. p. 252.
- 27) Klebs, Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. XX. p. 488.
- 28) Weyl, Deutsche med. Wochenschr. 1891. No. 7.
- 29) Aronson, Centralbl. f. inn. Med. 1902.
- 30) Helbing, C., Deutsche med. Wochenschr. 1900. p. 133. Vereinsbeil.
- 31) Philibert, André, Les pseudo-bacilles acido-résistants, critique des méthodes de coloration du bacille tuberculeux.
— —, Revision du groupe des bacilles dits acido-résistants. Paris 1908.
- 32) Sacharoff, Arch. f. mikr. Anat. Bd. XLV. 1895.
- 33) Klein, Centralbl. f. inn. Med. 1899. No. 4 u. 5.
— —, Fol. haemat. 1904. No. 2.
- 34) Barker, Bull. of the Johns Hopkins. Hosp. Baltimore. 1894. Okt.

Inhalt.

- | | |
|---|---|
| <p>Berghaus, W., Ueber die Beziehungen des Antitoxingehaltes des Diphtherieserums zu seinem Heilwert, p. 87.</p> <p>Bernstein, Eugene P., Some preliminary studies on the growth of the typhoid and the colon bacillus on media containing blood and carbo-hydrates, p. 1.</p> <p>Bertarelli, E. und Cecchetto, E., Weitere Untersuchungen über die Aetiologie des Trachoms, p. 36.</p> <p>Brekke, Untersuchungen betreffend die Erzielung von Keimfreiheit bei milzbrandsporenhaltigen Fellen und Häuten, p. 101.</p> <p>Crescenzi, Giulio, Ueber den Einfluß der Agglutination auf die kulturellen, agglutinierenden und bakteriolytischen Eigenschaften des Typhusbacillus, p. 81.</p> <p>De Waele, Henri, Protéolase et anti-protéolase dans les cultures microbiennes, p. 40.</p> <p>Dieudonné, A., Blutalkaliagar, ein Elektivnährboden für Choleravibrionen, p. 107.</p> <p>Fontes, A., Ueber eine in den tuberkulösen Lymphdrüsen vorhandene Tuberkelbacillen tödende Substanz, p. 78.</p> <p>Gasis, Demetrius, Ueber eine neue Reak-</p> | <p>tion der Tuberkelbacillen und eine darauf begründete differenzialdiagnostische Färbungsmethode derselben, p. 111.</p> <p>Huntemüller, Der Dieudonné'sche Blut-Alkali-Agar, p. 109.</p> <p>Podwysoski, W. und Adamoff, A., Ueber die verschiedene Wirkung der Pyocyanase auf Mikroben in festen und flüssigen Nährböden sowie auf Virus und Vaccine des <i>Vibrio cholerae asiaticae</i>, p. 44.</p> <p>Stickdorn, Walther, Beitrag zur Biologie des Rotlaufbacillus, p. 5.</p> <p>Streng, Osv., Studien über das Verhalten des Rinderserums gegenüber den Mikroben, p. 47.</p> <p>Terni, Camillo, Contribution à l'étude de la variole et du vaccin et des autres maladies similaires, p. 23.</p> <p>Vincenzi, Livio, Zur kulturellen Unterscheidung zweier Pseudotuberkulosebacillen (<i>Bacillus Pfeiffer</i> und <i>Bacillo opale agliaceo Vincenzi</i>) der Nagetiere, p. 2.</p> <p>Zeuner, W., Spezifische Behandlung bei experimenteller Tuberkulose, p. 95.</p> |
|---|---|

Frommannsche Buchdruckerei (Hermann Pohle) in Jena.

Nachdruck verboten.

Zur Frage der Fleischvergiftungen durch den *Bacillus paratyphi B*¹⁾.

[Aus dem hygienischen Institut der Universität Leipzig
(Direktor: Geh. Med.-Rat Prof. Dr. Hofmann).]

Von Dr. H. König, K. S. Oberarzt, kommandiert zum Institut.

Das in jüngster Zeit der Paratyphusfrage entgegengebrachte Interesse, welches sich vorzüglich im vergangenen Jahre in der Literatur gezeigt hat, rechtfertigt meines Erachtens die Mitteilung der nicht uninteressanten Ergebnisse einer hier im Institut zur Untersuchung gekommenen Fleischvergiftungsepidemie.

Eine kurze Zusammenfassung des gegenwärtigen Standes der Frage erscheint mir hierbei um so erwünschter, als es mir beim Studium der neuesten Literatur schien, als ob gewisse Unklarheiten in der Beurteilung der Sache Platz gegriffen hätten.

Während man früher die Fleischvergiftungen im wesentlichen nur als eigentliche „Vergiftungen“, d. h. durch Ptomaine etc. hervorgerufen, auffaßte, machten 1885–1888 Gaffky und Paack (2) und Gärtner (1) zuerst auf die Möglichkeit einer bakteriellen Infektion aufmerksam.

Was nun speziell den Paratyphus B-Bacillus als Fleischvergifter betrifft, so muß man, obwohl ihn 1900 Schottmüller (4) zuerst als spezifischen Krankheitserreger bezeichnete und auch schon von einer nahen Verwandtschaft mit den „Fleischvergiftern“ sprach, doch H. Trautmann (5) (Hamburg) das Verdienst zuerkennen, 1903 als erster an einem konkreten Falle bei der Düsseldorfer Fleischvergiftung (1901) diesen Keim einwandfrei nachgewiesen und ihn bestimmt mit den Fleischvergiftern (Typus Aertryk) identifiziert zu haben.

Auf dieser Grundlage aufbauend, erschienen dann die bedeutsamen Forschungsergebnisse von B. Fischer (6), der aus Muskeln und Organen zweier Kühe, deren Fleisch eine Epidemie von 50 Fällen veranlaßt hatte, P. B züchtete, Schottmüller (9), Conradi (10), der eine Mischinfektion von Typhus und P. B beschreibt, Levy und Fernet (11), welche gelegentlich einer Nahrungsmittelvergiftungs-Epidemie die Erfahrung machten, daß Filtrate von Bouillonkulturen von P. B sich als unschädlich erwiesen, und Kutscher und Meinicke (12), die, ebenso wie Poppe (29), die Identität des P. B mit dem Mäusetyphusbacillus und die kulturelle Gleichheit mit dem *Bacillus enteritidis* Gärtner feststellten.

Völlig eindeutig und auch für die größten Zweifler unbedingt beweiskräftig hat Kutscher (13) die große Berliner Epidemie vom Herbst 1906 untersucht und beschrieben. Es gelang ihm, sowohl aus dem von sämtlichen Erkrankten genossenen rohen (teilweise auch ganz leicht angebratenen) Schabefleisch, als auch aus dem Stuhl von erkrankten Personen, aus Organen und Darminhalt von Verstorbenen und aus Organen der nach Fütterung mit dem verdächtigten Fleisch eingegangenen Mäuse den P. B-Bacillus zu züchten; außerdem wurde festgestellt, daß ihn das Blut-

1) Nach einem in der militärärztlichen Gesellschaft zu Leipzig gehaltenen Vortrage.

serum vieler Erkrankter (16 von 20) in Verdünnungen von 1:200—1:500, einmal sogar bis 1:1000 agglutinierte. Bemerkenswert war dabei, daß die Agglutination erst nach 2-stündigem Brutofenaufenthalt und 18 bis 20-stündigem Stehen bei Zimmertemperatur vollendet war, eine Tatsache, die auch wir bei einem unserer Fälle beobachten konnten; wir nahmen jedoch Anstand, es diagnostisch zu verwerten, weil es der bislang unwidersprochenen, von Kolle-Hetsch (30) zitierten, Lentzschen Forderung widerspricht, nach welcher eine später als $\frac{1}{2}$ Stunde auftretende Agglutination von P. B-Bacillen nicht mehr als ganz einwandfrei spezifisch angesehen werden könne, weil eine „erst nach mehrstündiger Einwirkung auftretende Agglutinationswirkung auf Nebenagglutinine zurückzuführen“ sei.

Rolly (14) unterscheidet, ähnlich wie Trautmann (8), ziemlich scharf eine „gastrische“ und eine „typhöse“ Form der Erkrankung, was neuerdings ziemlich allgemein angenommen ist, und glaubt, daß bei Massen-Erkrankungen meist die erstere auftrete. Er betont, daß die gastrische Form, wenn akut einsetzend, durch vorgebildete Toxine im wesentlichen verursacht werde [s. a. Ruge und Rogge (25)], während er die Erkrankungen mit längerer Inkubationsdauer als „rein bakteriellen Ursprungs“ aufgefaßt wissen möchte.

Der äußerst seltene Befund wirklicher Darmgeschwüre wurde von Heller (16) bei einer Epidemie erhoben, bei welcher ein „zum P. B gehöriger“ Keim aus der Milz eines Verstorbenen gezüchtet worden war. — Buchholz (18) betont die Notwendigkeit der Prüfung des Gelatinewachstums von aus Kot gezüchteten, P. B verdächtigen Stäbchen, wegen der möglichen Verwechslung mit einer (allerdings seltenen) Proteus-Art, die ebenfalls Lackmusmolke bläut und auch sonst ähnliche kulturelle Eigenschaften, wie die Fleischvergifter, besitzt. — Die von Fromme (17) mitgeteilte P. B-Epidemie in H. verdient auch deshalb besonderes Interesse, weil sie durch das Fleisch eines Schweines hervorgerufen wurde, welches mehrere eitrige Abscesse aufwies und trotzdem von dem betreffenden Schlachthofe aus als „gesund“ freigegeben worden war. Verf. betont mit Recht die Möglichkeit, daß solche Abscesse (wie schon von Gaffky und Paack, v. Drigalsky und Fischer beschrieben) durch P. B hervorgerufen sein können, und stellt sich vollkommen auf den Standpunkt v. Drigalskys (7), welcher (schon 1903) die Forderung aufstellte, daß Milz und Muskulatur eines jeden notgeschlachteten oder erkrankten Tieres bakteriologisch untersucht, und jedes Tier, bei dem Infektion mit Fleischvergiftern (enteritidis Gärtner) gefunden werde, „unbedingt zu vernichten“ sei. Diese Forderung findet ja bekanntlich neuerdings (seit 1. Januar 1909) bei der amtlichen Fleischschau teilweise Berücksichtigung: In Fällen septischer Erkrankungen muß ein aus der Tiefe eines größeren Fleischwürfels entnommenes Stück bakteriologisch untersucht werden¹⁾.

In epidemiologischer Beziehung sehr bemerkenswert ist die von Tiberti (20) in Bologna gemachte Beobachtung, daß genau zur Zeit der von ihm beschriebenen, durch „einen zum P. B gehörigen Bacillus“ hervorgerufenen Fleischvergiftungsepidemie dort außerordentlich viele Fälle von Schweinepest vorkamen! Aus roher Wurst, sowie aus den Stühlen mehrerer Erkrankter konnte von ihm der Bacillus gezüchtet werden, und die 5 untersuchten Blutsera zeigten, wie Rocchi (19) mit-

1) Verordnung des Kgl. Sächs. Ministeriums des Innern.

teilt, spezifische Agglutination. — Ruge und Rogge (25) berichten über eine in der Offiziersmesse an Bord eines Kriegsschiffes aufgetretene Epidemie, bei welcher mehrere Personen an (leichter) akuter Nephritis erkrankten (ein sonst nicht häufig beschriebenes Vorkommnis). Die Stuhluntersuchung ergab P. B-Bacillen in mehreren Fällen, davon 1mal noch nach 4 und 1mal noch nach 5 Wochen. Das Blutserum agglutinierte den Keim in einer Verdünnung von 1:50.

Sehr interessante Mitteilungen machte in einem Vortrage Dieudonné (21) über in München erhobene P. B-Befunde in Milz, Leber und in der Gallenblase von mit septischen Erscheinungen erkrankten Schlachttieren. Zum genaueren Studium der allgemeinen Verhältnisse unserer Frage und besonders der Literatur bis mit 1907 sei auf die zusammenfassende Abhandlung dieses Autors besonders hingewiesen (22).

Wegen ihrer einschneidenden Wichtigkeit für die Beurteilung der ganzen Frage möchte ich im nachstehenden auf die von Uhlenhuth, Hübener, Xyländer und Bohtz (26) an einem großen Material gemachten Untersuchungen über das Vorkommen des mit dem P. B identischen Schweinepestbacillus im Darm gesunder Schweine etwas näher eingehen.

Bei 600 gesunden Schweinen fanden sie in 8,4 Proz. diesen Keim, während er unter 178 kranken in 45,4 Proz. der Fälle gefunden wurde. „Durch Einspritzungen von Organextrakt etc. schweinepestkranker Tiere, welches filtriert und bakterienfrei ist“, kann nach diesen Autoren eine „der Schweinepest in klinischer und pathologisch-anatomischer Beziehung völlig gleichende, oft tödlich endende Krankheit“ hervorgerufen werden. Aus diesen und noch einigen anderen, bei ihren Versuchen gewonnenen Gesichtspunkten heraus gelangen nun die Verff. zu dem Schluß, daß nicht der *Bacillus suipestifer* — alias P. B, alias *Mäusetyphus bacillus* [Pope (29)] — der Erreger der Schweinepest (und der nord-amerikanischen Hogcholera) sei, sondern ein „filtrierbares, ultravisibles Agens.“ In dieser apodiktischen Form bedarf nun meines Erachtens doch der Satz noch einigermaßen der endgültigen Bestätigung, weil ihn zunächst schon einige Untersuchungsergebnisse der Verff. nicht ganz unwidersprochen lassen, wie sie selbst an einzelnen Stellen der großen Arbeit zugeben: z. B. ist es ihnen, wenn auch nicht durch subkutane und stomachale, so doch durch „intravenöse Injektion größerer Kulturmengen“ gelungen, bei gesunden Ferkeln Erkrankungen hervorzurufen! Weiterhin war es den Verff. selbst auffallend, „daß in vielen, durch filtriertes, keimfreies, virulentes Material verursachten Fällen von Schweinepest der Hogcholerabacillus in den Organen zu finden war“ (unter 60 Fällen 24mal!), ein Befund, den (nach der Verff. Zeugnis) auch Ostertag und Hutyra erhoben haben. Das bleibt zunächst noch ein ungelöstes Rätsel, wenn man nicht mit Lourens (32) annehmen will, daß durch die Filter vielleicht doch einige Bakterien durchgegangen waren, die auf den Prüfungsnährböden kein Wachstum hervorbringen konnten, während sie in den ihnen zusagenden Tierkörpern wuchsen und auch die Krankheitserscheinungen hervorriefen. Hierfür spräche neben anderem in gewisser Beziehung sehr die interessante, von den Verff. (u. a.) gemachte Beobachtung, daß Stämme durch einige Tierpassagen wieder virulent gemacht werden konnten, nachdem sie diese Eigenschaft (und die Fähigkeit der Toxinbildung) durch jahrelanges Ueberimpfen auf künstliche Nährböden verloren hatten.

Daß nun „in vielen Fällen eine krankmachende (oder vielleicht besser: Eine bei den Tieren bemerkbare! Verf.) Wirkung nach Einverleibung von großen Dosen Schweinepestbacillen nicht erzielt wird“, läßt sich zweifellos durch Virulenzschwankungen einerseits und vor allem durch Mangel an Empfänglichkeit andererseits ungezwungen erklären; geben doch die Verff. selbst (mit vielen anderen Autoren) an einer Stelle zu, daß „künstliche Infektion mit dem *Bacillus suispestifer* Schweine nicht nur krank machen, sondern auch die für Pest charakteristischen Darmveränderungen hervorrufen kann“!

Uebrigens blieben, die oben angeführten Prozentzahlen (8,4 Proz. gesunde gegenüber 45,4 Proz. erkrankte Schweine mit positivem Bacillenbefund) als feststehend angenommen, immer noch 37 Proz. mit „unerkklärlichem“ positiven Bacillenbefund, die unbedingt nicht etwa schon vor der Erkrankung die Bacillen beherbergt haben! Bei diesen wurden also sicher die Bacillen nur gefunden, weil sie krank waren, und nicht, weil sie so wie so „häufig“ (? Verf.) im Darm gesunder Schweine gefunden werden! Diese Unklarheiten werden auch durch die neueren Ausführungen Hübener's (33) nicht aus der Welt geschafft.

Wenn nun weiterhin zur Erklärung dieser, ihnen selbst „auffälligen“, Tatsache die Verff. die Ansicht aussprechen, daß bei den kranken Tieren die Bacillen leichter nachweisbar wären, weil bei ihnen eine Anreicherung „im kranken Organismus stattgefunden habe, so muß dem entgegengehalten werden, daß jedenfalls im Darm kranker, d. h. meist diarrhoischer Tiere eher von einer Abnahme, wie von einer Vermehrung der Keime die Rede sein kann. Es ist ja z. B. auch (nach den mündlichen Mitteilungen des Herrn Privatdozenten Dr. P. Schmidt) eine bei der Typhusbekämpfung im westlichen Deutschland stets beobachtete Tatsache, daß die Bacillenbefunde in diarrhoischen Stühlen Typhuskranker weit seltener sind, als in den geformten, eine Erfahrung, die wir hier im Institut durchaus bestätigen konnten.

Vor allzu weitgehenden Schlüssen (wie sie sich bereits in der Literatur zu zeigen beginnen) bezüglich der „Ubiquität“ des Schweinepestbacillus als „Bewohner des normalen Schweinedarms“ muß meines Erachtens vorerst doch noch sehr gewarnt werden, denn selbst wenn die von den genannten Autoren gefundene Prozentzahl allgemeine Gültigkeit hat, so wäre es bei einem Tier von den Lebensgewohnheiten des Schweines, das alles, häufig auch Kot, zu fressen pflegt, gar nicht so ungereimt, etwa 8,4 Proz. gesunde Bacillenträger anzunehmen: diese Dauerausscheider könnten sehr wohl eine leichte Erkrankung durchgemacht haben, ohne daß das Stallpersonal des betreffenden Züchters etwas Besonderes gemerkt oder gesagt hätte; sind doch die meisten Schweineställe so eingerichtet, daß das Futter von außen in den Trog geschüttet wird und man das Tier selbst nur ungenügend beobachten kann¹⁾.

Teilweise auf dem Ergebnis dieser Untersuchungen basierende, bemerkenswerte Mitteilungen macht Hübener (23) „über das Vorkommen von P. B-Bacillen in der Außenwelt“, die in der kurzen Zeit, seit sie erschienen sind, bereits einiges Aufsehen gemacht haben. Obwohl nur die Ergebnisse der Hübener'schen Arbeit sehr wertvoll bei Beurteilung

1) Darüber, ob auch in anderen großen Schlachthöfen der Prozentsatz des Vorkommens von Schweinepestbacillen im Darm gesunder Schweine ein gleicher ist, sind gegenwärtig hier im Institut Untersuchungen im Gange, die an dem Material des hiesigen Schlachthofes angestellt werden.

mancher Fälle sind, so müssen doch die von ihm gezogenen Schlüsse nach verschiedener Richtung hin als zu weitgehend bezeichnet werden. Es wurden von ihm aus 6 von 100 untersuchten Wurstproben, die „aus den verschiedensten Quellen stammten“, dem P. B. völlig gleichende Bacillen gezüchtet, ohne daß Gesundheitsstörungen nach dem Genuß aufgetreten wären. Einen analogen Befund erhob gleichzeitig mit Hübener Rimpau (24), der auf äußerlich völlig einwandfreier Leberwurst, deren Genuß ebenfalls keine Schädigungen hervorgerufen hatte, diesen Keim fand. Meines Erachtens beweisen solche Befunde nun durchaus nicht, daß dieselbe bacillenhaltige Wurst bei anderen, etwas empfindlicheren, oder „disponierteren“ Menschen nicht hätte Erscheinungen machen können (und vielleicht sogar leichtere, unbeachtete gemacht hat!); noch weniger ist bewiesen, daß die Wurst, bei warmer Außentemperatur einige Tage älter geworden, nicht Gesundheitsstörungen hätte hervorrufen können. Wenn deshalb Hübener den Satz aufstellt, daß „ein klinisch als P. verlaufender Fall, bei dem in den Ausscheidungen P. B.-Bacillen nachgewiesen werden, ätiologisch gar nicht mit dem letzteren im Zusammenhang zu stehen braucht“, so könnte man demselben für ganz vereinzelte Fälle vielleicht beistimmen; wenn er jedoch in seiner Zusammenfassung von Wurstwaren, in denen P.-Bacillen gefunden werden, den Ausdruck „genußtauglich“ gebraucht, so darf dies meines Erachtens doch im Interesse der allgemeinen Gesundheitspflege nicht unwidersprochen bleiben, ebenso wie (selbst nach seinen eigenen Befunden) die Behauptung, daß diese Bakterien in der Außenwelt „meist“ verbreitet seien, doch sehr der Einschränkung bedarf; erwähnt doch Hübener selbst an anderer Stelle, daß er bei allen 180 von ihm untersuchten Stühlen Gesunder keine P. B.-Bacillen gefunden habe! Wohl zu berücksichtigen ist auch der Umstand, daß Hübener zugibt, stets nur sehr geringe Mengen von Bakterien in der betreffenden Wurst gefunden zu haben, was der Möglichkeit Raum gibt, daß die wenigen vorhandenen Bakterien nicht zur Auslösung von nennenswerten Krankheitserscheinungen ausgereicht haben; daß aber die Intensität unserer Erkrankung und die Infektionsmöglichkeit in erster Linie von der Menge der aufgenommenen Bacillen abhängig ist, wird von vielen Autoren betont [Schottmüller (9) u. a.].

Eine Veröffentlichung von Marx (28) erscheint mir in mehrfacher Hinsicht recht bemerkenswert: Einmal weil hier eine P. B.-Epidemie beschrieben wird, die so vollständig und einwandfrei festgestellt wurde, wie es selten möglich ist, und zweitens, weil trotzdem der Verf. — offensichtlich auf Grund der von ihm zitierten Hübenerschen Arbeit — es nicht für richtig hielt, den P. B.-Bacillus als eigentliches ätiologisches Moment zu bezeichnen, sondern annimmt, daß durch in der Wurst (vermutlich!) gebildete Ptomaine Magen- und Darmkatarrhe verursacht worden seien; „und“ nur diejenigen Leute, welche „in ihrer (Wurst-) Portion genug P. B. bekommen hatten“, „bekamen diesen dazu“, weil „durch die Darmreizung der Boden für die Ansiedelung geschaffen war“. So wenig nun die Richtigkeit des Satzes bestritten werden soll, daß durch Darmreizung eine Disposition geschaffen werden kann, so kann man doch dem Verf. in diesem Falle nicht ganz beistimmen: Denn einen viel schärferen Beweis kann man für die Infektion der 43 Erkrankungen mit dem *Bacillus* kaum erwarten, wie den Umstand, daß sowohl aus den beiden eingesandten Stühlen, als auch aus einem kleinen „nicht riechenden und nicht schlecht aussehenden“ Reste der ver-

dächtigen Wurst P. B-Bacillen isoliert werden konnten, und daß das Blutserum von 41 (von 43) Erkrankten P. B-Bacillen agglutinierte (meist bis 1:800!).

Beachtenswert ist übrigens die Mahnung des Verf., daß die Aerzte mehr als bisher zu diagnostischen Zwecken kleine Blutproben zur Untersuchung entnehmen sollten, und Stuhlproben erst nach einer solchen, schnell anzustellenden, Untersuchung in Betracht zu ziehen seien, ein Verfahren, welches wir hier im Institut seit langer Zeit mit großem Erfolg zum Ausfinden gesunder und kranker Typhusbacillenträger anwenden. Bei dieser Gelegenheit möchte ich erwähnen, daß auch hier, in Anbetracht der eminenten Vorteile dieser Methode, mit abgetöteter Kultur gearbeitet wird, allerdings nicht mit der von Marx empfohlenen Formalin-Bouillon, sondern mit einer formalinisierten Agarkulturemulsion [Loele (15)], deren Brauchbarkeit für die tägliche Praxis durch die Untersuchungen von Sievert¹⁾ einwandfrei dargetan und noch wesentlich erhöht worden ist.

Aus den Ergebnissen der Arbeit (I. Teil) von Mühlens, Dahms und Fürst (27) — Mäusefütterungsversuche mit kulturell unverdächtigem rohem Schinken und Gänsebrust — bestimmte Schlüsse zu ziehen, will mir ebenfalls zunächst unmöglich scheinen, weil da doch meines Erachtens noch zu viel Unerklärliches zutage trat. Von 138 mit Fleischwaren gefütterten Mäusen gingen 74 = 53,4 Proz. zugrunde und bei den meisten wurden Fleischvergiftungsbakterien gefunden. Auffallend ist nun aber demgegenüber die Tatsache, daß von 40 Mäusen, welche zur Kontrolle keine Fleischwaren, sondern ihr gewöhnliches Futter bekamen, gleichwohl 6, d. h. 15 Proz. innerhalb von 3 Wochen eingingen, während die übrigen nach 3—4 Wochen getötet wurden (von diesen letzteren hätten möglicherweise ebenfalls noch einzelne eingehen können!); und auch bei einer von diesen eingegangenen Mäusen wurden aus Herz und Milz Bacillen vom Typus „enteritidis Gärtner II“ gezüchtet!

Kurz vor Abschluß dieser Arbeit teilten Waldmann und Fürst (31) in einem Vortrage 5 im Sommer im Münchener Garnisonlazarett beobachtete Fälle von akutem Brechdurchfall mit ziemlich ausgesprochenen nervösen Allgemeinsymptomen mit, bei denen sämtlich P. B-Bacillen nachgewiesen worden waren. Auch sie glaubten aber (wie Marx bei seinen Fällen), offenbar ebenfalls auf Grund des Umstandes, daß „in den letzten Jahren Bakterien der P.-Gruppe in großer Verbreitung in der Außenwelt gefunden worden seien“ die Erkrankungen nicht als P.-Infektionen bezeichnen zu dürfen, weil „im Serum niemals Agglutinine nachweisbar gewesen seien“. Um das Unwahrscheinliche eines solchen (nach der Annahme der Verff.) „zufälligen“ Bacillenbefundes bei 5 zur gleichen Zeit und am gleichen Ort mit den bekannten Symptomen Erkrankten darzutun, braucht man nur zu berücksichtigen, daß Hübener bei 180 untersuchten Stühlen Gesunder niemals P. B gefunden hat und auch bei den hiesigen, zahlreichen Stuhluntersuchungen der Befund von P. B zu den größten Seltenheiten gehört.

(Das Ausbleiben der Agglutination ist ebenfalls nicht absolut beweisend gegen P. B-Infektion, da ja bekanntlich auch solche Fälle vorkommen, und in dem Referat leider nicht angegeben ist, an welchen Krankheitstagen die Blutproben entnommen wurden und wie hoch bzw. wie niedrig angesetzt wurde.)

Im Nachstehenden möchte ich die von Herrn Dr. A. Trautmann, Assistenten am hiesigen Institut, und mir angestellten Untersuchungen

1) Die betreffende Arbeit wird in Kürze erscheinen.

über eine nach Genuß von P. B.-haltigem gepökeltem und geräuchertem rohen Schinken aufgetretene Massenerkrankung mitteilen.

Nach einem, Sonntag, 30. Aug. 1908, im Gasthof eines Vorortes von Leipzig stattgefundenen Erntefest erkrankten Montags plötzlich 24 Teilnehmer desselben an Kopfschmerz, Erbrechen, Durchfall und Fieberbewegungen, davon 2 unter sehr schweren Erscheinungen. Alle Erkrankten waren mehrere Tage lang erwerbsunfähig, die meisten 5–10 Tage lang in ärztlicher Behandlung. Bei dem Arbeiter G. traten so schwere Erscheinungen auf, daß der behandelnde Arzt am 2. Sept. seine Ueberführung nach dem Diakonissenhause Leipzig anordnete. Die wichtigsten Daten der recht charakteristischen Krankengeschichte, die ich Herrn Prof. Dr. Lange und Herrn Assistenzarzt Dr. Ladebeck verdanke, lasse ich hier folgen:

Der 24-jährige Mann konnte bei seiner Aufnahme wegen hochgradiger Hinfälligkeit nur mühsam die Angabe machen, daß er seit dem Morgen nach dem Erntefest an heftigem Erbrechen, Durchfall und Kopfschmerz gelitten habe. Das Krankheitsbild war äußerst schwer, der Patient verfiel unmittelbar nach seiner Aufnahme in einen comaähnlichen Zustand. Die Herzaktion war sehr schwach, die Extremitäten kühl, die Pupillen sehr weit. Das Erbrechen trat zeitweilig in den Hintergrund, es wurde ziemlich reichlich dünnflüssiger, etwas dunkler (nicht charakteristischer) Stuhl entleert. Wegen der bedrohlichen Herzschwäche wurde sogleich Digalen gegeben. Als sich daraufhin die Herztätigkeit etwas gehoben hatte, entschloß man sich am 2. Tage dazu, auf medikamentösem Wege noch einmal gründliche Magen- und Darmentleerungen herbeizuführen, woraufhin dann eine zunehmende Besserung des Allgemeinbefindens konstatiert werden konnte. Wegen der Herzschwäche wurde eine Spritze Ol. Camphorat. nötig. Vom nächsten Tage an bekam Patient dann 2mal täglich 0,5 Bismuth. subnit. mit Tannalbin und öfter täglich starken Kaffee bis zum 9. Tage. Die Besserung war während dieser Zeit so rasch fortgeschritten, das subjektive Befinden wieder so gut, daß der Patient, trotz der noch immer bestehenden Schwäche, am 15. Tage (entgegen dem Rat des Arztes) seine Entlassung durchsetzte, nachdem er seit 2 Tagen außer Bett gewesen war. Bemerkenswert ist noch, daß der Urin stets eiweißfrei, die Leukocytenzählung ohne besonderes Ergebnis war. Die angestellte Diazoreaktion war positiv.

Auf Ansuchen war am 5. Sept. (also ungefähr dem 6. Erkrankungstage) eine Blutprobe ins Institut gesandt worden. Die mehrfach verlangte Stuhlprobe konnten wir jedoch leider nicht bekommen.

Das Blutserum wurde auf seine Agglutinationsfähigkeit mit P. B.- und Typhus-emulsion geprüft: Es agglutinierte deutlich P. B.-Bacillen in einer Verdünnung von 1:50 innerhalb $\frac{1}{2}$ Stunde, während die Agglutination bei 1:80 und 1:100 erst nach längerer Zeit und nur schwach angedeutet festzustellen war. Typhusbacillen wurden von dem Blutserum nicht agglutiniert.

Durch die Ermittlungen des Bezirksarztes, Herrn Geheimrat Dr. Siegel, dem ich die Mitteilung mannigfacher, von ihm erhobener, interessanter Einzelheiten verdanke, wurde festgestellt, daß nur solche Personen erkrankt waren, welche kalten Aufschnitt gegessen hatten, während die übrigen Gäste, die andere Speisen (Gänse- und Entenbraten etc.) genossen hatten, gesund geblieben waren. Von den sämtlichen Bestandteilen des Aufschnittes, Kalb- und Schweinefleisch, 2 Wurstsorten, rohem Schinken und Schweizerkäse wurden von Herrn Geheimrat Siegel Proben entnommen und gingen dem Institut, einzeln in weißes Papier gewickelt, zu. Sie hatten, was ausdrücklich betont sei, ausnahmslos ein durchaus frisches und gutes Aussehen und keine Spur von üblem Geruch.

Von den 6 eingesandten Proben wurden Plattenserien von Drigalsky-Agar, Bouillon- und Anaërobenkulturen mit Traubenzuckeragar angelegt und außerdem weiße Mäuse mit den verschiedenen Sorten gefüttert; diese blieben jedoch, um das gleich vorwegzunehmen, ohne merkbare Krankheitserscheinungen.

Von allen Proben wurden verdächtige, auf Drigalsky gewachsene, Kolonien auf Agar abgestochen und von hier aus dann in Milch, Lackmusmolke und Traubenzuckeragar übergeimpft.

Während Käse und Knackwurst diese Nährböden ganz unverändert ließen, hatten die von den übrigen 4 Proben stammenden Kolonien mehr oder weniger starke Rötung in Lackmusmolke, und geringe Gasbildung in Traubenzuckeragar bewirkt; der Schinkenkeim hatte außerdem die Lackmusmolke noch eine Spur getrübt und auch bedeutend mehr Gas gebildet, als die anderen.

Tags darauf hatte der Schinkenkeim die Lackmusmolke deutlich gebläut, getrübt und mit einem Häutchen überzogen, während die von Kalb- und Schweinefleisch und Cervelatwurst herstammenden Keime weder jetzt noch auch später eine Veränderung in ihrem Verhalten zeigten.

Es wurden nun Aufschwemmungen von den 4 durch ihr Wachstum verdächtigen Keimen hergestellt und jeder Stamm auf seine Agglutinationsfähigkeit mit Typhus-

polyvalentem P. B- und enteritidis Gärtner-Serum geprüft: Der Keim aus dem rohen Schinken wurde durch das P. B-Serum nach 10 Minuten in einer Verdünnung von 1:100, nach 1 Stunde von 1:1500 und nach ca. 2 Stunden von 1:3000 deutlich agglutiniert, während alle übrigen angesetzten Röhrchen — auch das mit enteritidis Gärtner-Serum — völlig homogen geblieben waren.

Damit war erwiesen, daß der Schinken P. B-Bacillen enthielt.

Von 2 mit je $\frac{1}{4}$ Normalöse Agarkultur subkutan geimpften weißen Mäusen wurde die eine tags darauf sehr krank (verklebte Augen, keine Freßlust etc.) und starb 2 Tage nach der Impfung. Aus dem Herz- und Milzblut konnten wieder durch spezifische Agglutination mit dem polyvalenten Serum nachzuweisende, P. B-Bacillen gezüchtet werden. Die 2. Maus starb ebenfalls, jedoch erst 5 Tage nach der Infektion.

Auf die erhobenen Befunde hin wurde der Schinken unter polizeilicher Kontrolle vernichtet und eine gründliche Reinigung aller mit ihm in Berührung gekommenen Gerätschaften etc. vorgenommen. Von einer Freigabe des Schinkens nach vorherigem Kochen glaubte man besser absehen zu sollen, da es nach den Feststellungen zahlreicher Autoren [Schottmüller (9), Rolly (14), Uhlenhuth (26) u. a.] sicher zu sein scheint, daß der P. B-Bacillus entgegen der Ansicht anderer, imstande ist, hitzebeständige Toxine zu bilden.

Weder gegen den Gastwirt, noch auch gegen den Fleischer wurde weiter vorgegangen, einmal weil durch Revisionen bei dem Gastwirt die peinlichste Reinlichkeit festgestellt und auch bei dem Fleischer gröbere Unreinlichkeit nicht gefunden wurde, weiterhin, weil die Lieferung bereits 5 Monate zurücklag und mit forensisch verwertbarer Sicherheit nicht festgestellt werden konnte, wie der Schinken infiziert worden war.

Wenn sich also auch die wichtige Frage nach dem wahrscheinlichen Infizierungsmodus des Schinkens nicht ohne weiteres beantworten läßt, so kann doch die Annahme, daß die Verunreinigung bei dem Gastwirt (etwa durch das Messer oder eine infizierte Hand) stattgefunden haben könne, ruhig ausgeschlossen werden, weil zu wichtige Gründe dagegen sprechen: Zunächst der Umstand, daß **nur** der Schinken, der von einem anderen Fleischer stammte, als die Wurst und der Braten, die pathogenen Keime enthielt, dann daß die infiziert gefundene Probe unter den Augen des Herrn Geheimrat Siegel mit einwandfreiem Messer aus der **Mitte** des Schinkens entnommen worden ist, und schließlich, daß bei dem Gastwirt mustergültige Reinlichkeit herrschte.

Noch eine interessante Tatsache scheint mir den Wirt wenigstens in dieser Hinsicht zu entlasten: Er hat nämlich, wie er selbst erzählte, einen „Gelegenheitskauf“ (!) gemacht und für den Schinken **nur ungefähr** die Hälfte des sonst üblichen Preises bezahlt!

Den Fleischer belasten diese Tatsachen natürlich viel mehr, besonders wenn man erfährt, daß der Schinken ganz auffallend stark gepökelt und geräuchert war, und daß es „zufällig“ aus demselben Geschäft stammte (allerdings mit anderem Besitzer), von welchem vor einigen Jahren bereits eine Fleischvergiftungsepidemie ausgegangen war.

Daß Bacillen im Innern von Fleischwaren den Pökel- und Räucherprozeß lange Zeit überstehen können, haben die von Petri und Heim (3) 1890 im Kaiserlichen Gesundheitsamte angestellten Versuche für Schweine-rotlauf einwandfrei bewiesen. Sie fanden diesen Keim noch nach 3 Monaten virulent und erst nach 6 Monaten „anscheinend abgestorben“.

Für den P. B-Bacillus dürfte der von uns untersuchte Fall den Beweis liefern, und er ist, soweit mir aus der Literatur bekannt, der erste, bei dem die direkte Züchtung des P. B vom geräucherten, gut aussehenden Schinken einwandfrei gelungen ist.

Natürlich läßt sich der P. B-Bacillenbefund in Wurst bei dem Vorkommen im Darm der Schlachttiere leichter (etwa durch schlecht gewaschene Därme und durch Verwendung von Abfällen zur Wurstfabrikation) erklären, als auf Schinken. Da nun die Möglichkeit besteht, daß die Bacillen, beim Schlachten auf den Schinken gebracht, in den bis zum Einlegen in die Lake stets vergehenden Stunden genügend Zeit gefunden haben, nicht nur an der Oberfläche, sondern auch in die Muskelinterstitien und Messerschnittöffnungen hinein zu wachsen, so muß man ja auch an diese Infizierungsart denken. Viel wahrscheinlicher ist jedoch die Annahme, daß der Schinken von einem erkrankten Tier stammte und vom Lymph- bzw. Blutwege aus, entweder während des Lebens oder aber in der Agone infiziert worden ist.

In Kürze möchte ich noch von einem zweiten, hier im Institut zeitlich wenige Wochen vor dem anderen konstatierten Fall von Paratyphuserkrankung berichten.

Ein junger kräftiger Mann erkrankte einige Stunden nach dem Genuß von rohem Schabefleisch (an welchem jedoch nichts Verdächtiges aufgefallen war) plötzlich mit den Erscheinungen einer ganz schweren Gastroenteritis (Erbrechen, Durchfälle etc.). Aus dem Stuhl konnte P. B isoliert werden und das Blutserum agglutinierte den Keim in einer Verdünnung von 1:100. Eine Fleischprobe war leider nicht mehr zu bekommen. Erkrankungen anderer Kunden des betreffenden Fleischers wurden nicht bekannt, doch ist ja natürlich möglich, daß diese unter anderer Diagnose gegangen sind, oder nur geringe Erscheinungen gezeigt haben.

Die P. B-Erkrankung des Patienten war übrigens so schwer, daß er, nach mehrwöchigem Krankenlager (wegen der Herzschwäche), noch eine ziemlich langwierige Rekonvaleszenz durchzumachen hatte.

Zum Schlusse noch einmal zurückkommend auf die (oben besprochenen) Folgerungen, die Hübener (23) aus seinen eigenen Befunden und denjenigen der anderen dort genannten Autoren (26) zieht, möchte ich betonen, daß es bislang noch durchaus nicht erwiesen ist, daß etwa der P. B-Bacillus in größerer Verbreitung als **nichtpathogener** Keim in der Außenwelt vorkommt, daß aber andererseits sehr wohl seine oft sehr große Pathogenität als erwiesen gelten muß.

In prägnanter Weise drücken die Worte Rimpaus (24) den augenblicklich richtigen Standpunkt in unserer Frage aus: „Da wir kein Unterscheidungsmerkmal haben, das uns zeigt, ob der gefundene Paratyphusstamm für den Menschen pathogene Eigenschaften hat oder nicht, da die P. B-Bacillen eine größere Verbreitung unter den Menschen und ihren Nahrungsmitteln offenbar haben, und da wir schließlich nicht wissen, ob avirulente Stämme durch häufigere Menschenpassage zu virulenten werden können, so müssen möglichst Uebertragungen von Mensch auf Mensch vermieden werden. Einwandfreie Fäkalienbeseitigung und Wasserversorgung, einwandfreier Nahrungsmittelbetrieb, Erziehung der Bevölkerung zur Sauberkeit, Aufklärung über die einfachsten hygienischen Forderungen müssen die Lösung sein im Kampfe gegen die Verbreitung des Typhus und Paratyphus.“

Ohne also die von diesen Autoren (24) gemachten, höchst bedeutsamen Feststellungen irgendwie zu unterschätzen, und obwohl es meines Erachtens auch in forensischer Beziehung sehr zu begrüßen ist, wenn einer übertriebenen Bacillenfurcht an der Hand solcher Tatsachen in Fachkreisen etwas gesteuert werde, so sind und bleiben doch Nahrungsmittel, auf denen P. B-Bacillen nachgewiesen wurden, **unbedingt** vom Genusse auszuschließen.

Ich habe es für unerlässlich gehalten, diese Sätze aufzustellen, weil in der Literatur bereits Stimmen laut werden, die größere Vorsichts-

maßregeln gegenüber der Paratyphuserkrankung für mehr oder weniger überflüssig erklären, eine Auffassung, die bei dem augenblicklichen Stande der Forschung unbedingt zu verwerfen ist.

Für das an dieser Arbeit genommene Interesse bin ich Herrn Geheimrat Prof. Dr. Hofmann zu Dank verpflichtet.

Literatur.

- 1) Gärtner, Ueber die Fleischvergiftung in Frankenhausen a. Kyffhäuser und der Erreger derselben. (Corresp.-Bl. d. Allgem. ärztl. Ver. v. Thüringen. 1888. No. 9. Ref. von Gaffky u. Paak.)
- 2) Gaffky u. Paak, Ein Beitrag zur Frage der sogen. Wurst- und Fleischvergiftungen. (Arb. a. d. Kais. Gesundheitsamte. Bd. VI. 1890.)
- 3) Petri, Ueber die Widerstandsfähigkeit der Bakterien des Schweinerotlaufs in Reinkulturen und im Fleisch rotlaufkranker Schweine gegen Kochen, Schmoren, Braten, Salzen, Einpökeln und Räuchern. (Arb. a. d. Kais. Gesundheitsamte. Bd. VI. 1890.)
- 4) Schottmüller, Weitere Mitteilungen über mehrere das Bild des Typhus bietende Krankheitsfälle, hervorgerufen durch typhusähnliche Bacillen. (Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. Bd. XXXVI. 1900. p. 368.)
- 5) Trautmann, H., Der Bacillus der Düsseldorfer Fleischvergiftung und die verwandten Bakterien der Paratyphusgruppe. (Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. Bd. XLV. 1903. p. 139.)
- 6) Fischer, Zur Epidemiologie des Paratyphus. (Festschr. z. 60. Geburtstage von R. Koch. 1903. p. 271.)
- 7) v. Drigalsky, Ueber eine durch Genuß von Pferdefleisch veranlaßte Massenvergiftung. (Festschr. f. R. Koch. 1903.)
- 8) Trautmann, H., Wie verhalten sich die klinischen Affektionen: Fleischvergiftung und Paratyphus zueinander. (Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. Bd. XLVI. 1904. p. 68.)
- 9) Schottmüller, Zur Aetiologie der akuten Gastroenteritis (Cholera nostras). (Münch. med. Wochenschr. 1904. p. 294.)
- 10) Conradi, Ueber Mischinfektionen durch Typhus- und Paratyphusbacillen. (Deutsche med. Wochenschr. 1904. p. 1165.)
- 11) Levy u. Fornet, Nahrungsmittelvergiftung und Paratyphus. (Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. XLI. 1905. p. 161.)
- 12) Kutscher u. Meinicke, Vergleichende Untersuchungen über Paratyphus-, Enteritis- und Mäusetyphusbakterien und ihre immunisatorischen Beziehungen. (Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskr. Bd. LII. 1906. p. 301.)
- 13) Kutscher, Eine Fleischvergiftungsepidemie in Berlin infolge von Infektion mit dem Bact. paratyphi B. (Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskr. Bd. LV. 1906. p. 331.)
- 14) Rolly, Zur Kenntnis der durch das sogen. Bact. paratyphi hervorgerufenen Erkrankungen. (Deutsch. Arch. f. klin. Med. Bd. LXXXVII. 1906.)
- 15) Loele, Die Agglutination in den Händen des praktischen Arztes. (Deutsche med. Wochenschr. 1906. No. 4.)
- 16) Heller, Bakteriologische Befunde bei einer Fleischvergiftungsepidemie. (Centralbl. f. Bakt. etc. Abt. I. Orig. Bd. XLIII. p. 146.)
- 17) Fromme, Ueber eine Fleischvergiftung mit Paratyphus B. (Centralbl. f. Bakt. etc. Abt. I. Orig. Bd. XLIII. 1907. p. 775.)
- 18) Buchholz, Zur kulturellen Unterscheidung der Typhus-, Paratyphus-, Coli-Bakterien untereinander. (Zeitschr. f. Hyg. Bd. LVI. 1907. p. 220.)
- 19) Rocchi, Beitrag zum Studium der Serodiagnose bei den infektiösen, durch Nahrungsmittel verursachten, Gastroenteritiden. (Centralbl. f. Bakt. etc. Abt. I. Orig. Bd. XLIII. 1907. p. 202.)
- 20) Tiberti, Bakteriologische Untersuchungen über eine Fleischvergiftungsepidemie. (Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskr. Bd. LX. 1908. Heft 1.)
- 21) Diendoné, Aetiologie der Fleischvergiftungen. (Münch. med. Wochenschr. 1908. p. 939.)
- 22) — —, Die bakteriellen Nahrungsmittelvergiftungen. (Würzb. Abhandl. a. d. Gesamtgebiet d. prakt. Med. Bd. VIII. 1908. Heft 34.)
- 23) Hübener, Ueber das Vorkommen von Bakterien der Paratyphusgruppe in der Außenwelt. (Deutsche med. Wochenschr. 1908. p. 1044.)
- 24) Rimpau, Zur Frage der Verbreitung der Bacillen aus der Paratyphusgruppe. (Deutsche med. Wochenschr. 1908. p. 1045.)

- 25) Ruge u. Rogge, Die Paratyphuserkrankungen an Bord S. M. S. „Blitz“. (Centralbl. f. Bakt. etc. Abt. I. Orig. Bd. XLVII. 1908. Heft 5.)
- 26) Uhlenhuth, Hübener, Xylander, Bohtz, Untersuchungen über das Wesen und die Bekämpfung der Schweinepest. (Arbeiten a. d. Kaiserl. Gesundheitsamte. Bd. XXVII. 1908. p. 225.)
- 27) Mühlens, Dahms u. Fürst, Untersuchungen über Bakterien der Enteritisgruppe (Typus Gärtner und Typus Flügge), insbesondere über die sogen. Rattenschädlinge. (Centralbl. f. Bakt. etc. Abt. I. Orig. Bd. XLVIII. 1908. Heft 1.)
- 28) Marx, Ueber eine Paratyphus B-Epidemie beim Infanterieregiment „Hessen-Homburg“ No. 166. (Centralbl. f. Bakt. etc. Abt. I. Orig. Bd. XLVIII. 1908. Heft 1.)
- 29) Poppe, Beiträge zur vergleichenden Biologie des Bacillus suispestifer und des Bac. paratyphi B. (Zeitschr. f. Infektionskr., paras. Krankh. u. Hyg. d. Haustiere. Bd. V. 1908.)
- 30) Kolle u. Hetsch, Die experimentelle Bakteriologie und die Infektionskrankheiten. 2. Aufl. Berlin u. Wien 1908.
- 31) Waldmann u. Fürst, Epidemiologisches und Klinisches zum gegenwärtigen Stand der Paratyphusfrage. (Münch. med. Wochenschr. 1909. p. 153)
- 32) Lourens, Untersuchungen über die Filtrierbarkeit des Schweinepestbacillus (Bac. suispestifer). (Centralbl. f. Bakt. etc. Abt. I. Orig. Bd. XLIV. 1907. p. 420 ff.)
- 33) Hübener, Ist der Bac. suispestifer der Erreger der Schweinepest oder nicht? (Centralbl. f. Bakt. etc. Abt. I. Orig. Bd. XLVII. 1908. p. 586.)

Nachdruck verboten.

Ueber die Biologie des Pneumococcus von Fraenkel

[Aus der medizinischen Universitätsklinik zu Genua
(Vorstand: Prof. E. Maragliano).]

Von Dr. **Luigi Panichi**, Dozent und Dr. **Giulio Porrini**, Assistent.

Ins Deutsche übertragen von Dr. R. Rühl-Turin.

Mit 15 Figuren.

Die Bedeutung, welche der *Pneumococcus* (ödematogene Varietät von Foà) in der menschlichen Pathologie und in der sozialen Medizin hat, veranlaßte schon früher die Autoren dazu, ihr Augenmerk auf die Dauer der Lebensfähigkeit und des pathogenen Vermögens dieses Keimes in Nährböden zu richten.

Während einige Autoren [Emmerich (1), Bunzl-Federn (2)] angaben, daß die Virulenz sich 13 Monate erhält und daß das Leben bis zu 1 Jahr dauern kann (3), geben andere Autoren an, in welchem Nährboden und unter welchen Bedingungen sich der Keim am längsten und am meisten tätig bewahrt [(2) und Sclavo 4)].

Es wurden also die äußersten Grenzen sowohl der Widerstandsfähigkeit resp. Dauerhaftigkeit, wie der Aktivität festgestellt und ebenso wie für den *Pneumococcus*, bezieht sich auch für die übrigen Keime die Untersuchung stets auf die von der Aussaat, oder vom Beginne der Bakterienentwicklung entferntesten Perioden. Infolgedessen fehlen sowohl für den *Pneumococcus* wie für alle übrigen pathogenen Keime Untersuchungen über die pathogene Tätigkeit und den Verlauf derselben während der ersten 24—48 Stunden der Entwicklung des Keimes, nachdem derselbe von einer Mutterkultur in einen neuen Nährboden gebracht worden ist. Gegenwärtige Untersuchungen haben den Zweck, diese Lücke auszufüllen; es lag jedoch noch ein weiterer Grund vor, welcher uns dazu veranlaßte, sie vorzunehmen und auszuführen. Einer von uns (Panichi) hatte nämlich seit längerer Zeit beobachtet, daß es nicht immer gelang, die Kaninchen in kurzer Zeit und mit dem anatomisch-

pathologischen Bilde der akuten Septikämie zum Tode zu führen, auch wenn die in der 18.—20. Entwicklungsstunde — welche als die beste Zeit angesehen wird, um ein Virus mit dem höchsten pathogenen Vermögen zu erhalten — einzupflegenden Kulturen des *Pneumococcus* in besonderer Bouillon nach der früher (5) bestimmten Methode bereitet wurden.

Auf Grund dieser Mißerfolge wurde vermutet, daß die Aktivität der Kultur sich so ändern kann, daß ihr Höhepunkt nicht immer der 18.—20. kulturellen Entwicklungsstunde entspricht, weshalb es uns erforderlich erschien, das Verhalten der Virulenz einer Pneumokokkenkultur während den ersten 24—48 Entwicklungsstunden eingehender und ausführlicher zu untersuchen. Diesem Ziele entsprechend, wurden unsere Untersuchungen in folgender Weise ausgeführt:

Von einer von einem infizierten Kaninchen durch einen Aderlaß erhaltenen Kultur von Pneumokokken in Blut wurden Keime im Alter von 5 Tagen (von denen sie einen im Brutschrank und 4 bei Zimmertemperatur verbracht hatten) in ein besonderes Bouillonkulturmittel eingepflanzt, welches sich demjenigen nähert, welches Tizzoni und Panichi in ihren Veröffentlichungen als „brodo nostro (unsere Bouillon)“ bezeichneten.

Von der 8. Stunde an nach der Einimpfung, zu einer Zeit, wo die im Brutschrank gebliebene Kultur sich klar erhielt und nur mikroskopisch einzelne seltene und kurze Ketten von Keimen aufwies, wurden jede 4. Stunde, also mit gleichen Zwischenzeiten, 0,2 ccm Virus von der Kultur entnommen, und dies wurde bis zur 24. und 30., und in Ausnahmefällen bis zur 42. und 46. Stunde fortgesetzt. Weiter unten werden wir den Grund der verschiedenen Länge der Periode der kulturellen Proben erörtern.

Das Virus wurde immer in einer Menge von 0,2 ccm in die Vena marginalis des Ohrlappens eingespritzt, und es wurden dazu Kaninchen von möglichst gleichem Gewicht und einer mittleren Größe (durchschnittlich etwa 1500 g) angewendet.

Es wurde mit der größten Sorgfalt der Verlauf der Krankheit bei den verschiedenen Tieren festgestellt; so wurde immer der Moment genau aufgeschrieben, in welchem dem Tier die Einspritzung gemacht wurde, und meistens konnte auch die genaue Zeit des Todes festgestellt werden; wo dies ausnahmsweise nicht möglich war, wurde die Stunde des Todes nach dem Zustande der Leiche (Wärme derselben, begonnene Zersetzung usw.) annähernd bestimmt.

Wir müssen gleich erklären, daß bei den ersten zwei Versuchen die einzelnen Einspritzungen nicht nur mit anderen zeitlichen Zwischenräumen gemacht wurden, als wie die folgenden Experimente, sondern mit unregelmäßigen Zwischenräumen (7 Stunden statt 3 im letzten Teile des zweiten Versuches), weil uns die Reihenfolge der Erscheinungen unbekannt war und weil sich diese von einem Versuche zum anderen änderten.

(Bei Versuch X waren auch die Entnahmen der Probedosen unregelmäßig, weil uns die Erscheinungen bekannt geworden waren, und wir eine Hypothese kontrollieren wollten, mit welcher wir uns weiter unten befassen werden.)

Bei der ersten Reihe von Kaninchen zeigte das Virus in der 8. Entwicklungsstunde die Fähigkeit, das Tier mit einer 33 Stunden dauernden Krankheit zu töten. Dann erfuhr das Virus eine zunehmende Abschwächung bis zur 17. Entwicklungsstunde, so daß es nach 11 Stunden das Kaninchen mit einer 55 und nach 14 Stunden mit einer 58 Stunden dauernden

Krankheit tötete. Nachdem nun diese Abschwächung, wie gesagt, in der 17. Stunde der Entwicklung den höchsten Grad erreicht hatte, so daß das Virus zu dieser Zeit das Kaninchen mit einer Krankheit von 72 Stunden tötete, begann für dieselbe Kultur von neuem eine Reaktivierungsperiode, so daß die 20 Stunden alte Kultur das Kaninchen mit einer 48-stündigen Krankheit tötete, und dagegen nach 23 Stunden der Kulturentwicklung das Kaninchen infolge der Einspritzung von 0.2 ccm des Virus im Laufe von 38 Stunden zugrunde ging, also mit einer Krankheitsdauer, welche ungefähr derjenigen entspricht, welche zu Anfang, d. h. nach Einspritzung einer 8 Stunden alten Kultur, beobachtet wurde.

Kurz gesagt, der Verlauf des pathogenen Vermögens der Kultur entsprach einer parabelähnlichen Linie, in welcher die zwei Höhenpunkte der Virulenz den Enden (8 Stunden und 23 Stunden) und das Minimum der 17. Entwicklungsstunde entsprachen.

Wenn man bei dem II. Versuche mit einer Reihe von 7 Kaninchen annähme, daß der Beginn der pathogenen Aktivität statt der 8. erst der 13. Stunde entspräche, so würde sich auch hier dieselbe Erscheinung ergeben, wie bei dem ersten Versuche, nämlich daß sich eine sehr starke Virulenz zuerst abschwächt, um später ihren früheren Grad wiederzubekommen, also einer parabelähnlichen Kurve folgend.

Man kann aber nicht den Verlauf der Erscheinungen während der ersten 13 Stunden der Kultur außer acht lassen, welcher darin besteht, daß das Virus, das nach 8 Stunden der Entwicklung eine gewisse Aktivität besitzt, dieselbe verliert und dann wieder annimmt. So hätte man eine Kultur, deren Virulenz in den ersten Stunden der Entwicklung des Keimes sich nach einer Kurve ändert, welche einer doppelten Parabel entspricht.

Diese Tatsachen sind aber deutlicher ersichtlich bei der III. Reihe, wo im Laufe der ersten 28 Entwicklungsstunden die Kultur, welche im Alter von 8 Stunden ein Kaninchen in 36 Stunden tötet, zwei Abschwächungen (in der 12. und in der 20.) und zwei Reaktivierungen (in der 16. und in der 28. Stunde) erfährt.

Die verschiedenen Grade der Virulenz entsprechen somit bei diesem III. Versuche zusammen einer doppelt parabolischen Linie, oder einer aus vier Segmenten bestehenden Linie, welche zusammen den Buchstaben M darstellen, in welcher wir unterscheiden:

- die anfängliche Aktivität (nach 8 Stunden),
- die erste Abschwächung (nach 12 Stunden),
- die erste Reaktivierung (nach 16 Stunden),
- die zweite Abschwächung (nach 20 Stunden),
- die zweite Reaktivierung (nach 24—28 Stunden).

Nun ist es klar, sowohl beim II. wie beim III. Versuch, daß das Virus in einer gewissen Periode seiner Entwicklung ein Maximum der Aktivität aufweist, dasselbe, welches bereits 1903 von Tizzoni und Panichi hervorgehoben wurde.

Bevor wir uns aber mit dieser Erscheinung des „Wiedervirulentwerdens“ befassen, erscheint es uns angezeigt, den gesamten Verlauf des pathogenen Vermögens der Kultur in besonderer Bouillon während der ersten 24—48 Stunden ihrer Entwicklung durch Untersuchung von 12, zu diesem Zwecke ausgeführten Versuchsreihen zu betrachten.

Bei sieben derselben (II, III, IV, VI, VII, X, XII) entspricht der Verlauf der Virulenz mehr oder minder deutlich einer Linie, welche an

ein großes M erinnert; bei vier anderen (I, V, IX, XI) erinnert der Verlauf der Aktivität des Virus an eine parabolische Linie; bei dem VIII. Versuch hatte die Kurve eine sonderbare Form, welche in den zwölf von uns wiederholten Versuchen einzig und allein blieb, weshalb wir sie nicht in geeigneter Weise deuten können.

Dagegen wollen wir unsere Aufmerksamkeit auf einige Charaktere der beiden übrigen Typen, d. h. des häufigeren M-Typus und des weniger häufigen Parabeltypus, richten. Bezüglich derselben müssen wir gleich erklären, daß wir glauben, nicht unrichtig vorgegangen zu sein dadurch, daß wir in den Fällen, wo die Abschwächung des Virus einen so hohen Grad erreichte, daß das Virus nicht mehr das Tier tötete (Virus der 20.—24. Stunde in der V. Reihe und der 39. Stunde in der X. Reihe) den Verlauf der Virulenz während dieser Periode durch eine punktierte Linie angedeutet haben, um der Kurve eine regelmäßige Form zu geben. Es ist leicht begreiflich, daß das Virus, wenn es zu einer dem Momente, wo die vorhergehende Abschwächung nachgewiesen wurde, oder dem Momente, wo das folgende Wiedervirulentwerden nachgewiesen wurde, näheren Zeit untersucht worden wäre, das Kaninchen getötet hätte.

Andererseits wird die Tatsache nicht geändert; die Abschwächung war vorhanden und in solchem Grade, daß sie (in der angewendeten Dosis) der Inaktivierung der Kultur entsprach; deshalb wird uns der durch eine punktierte Linie angedeutete Teil der Kurve nicht den genauen Wert des Virus, sondern die Qualität desselben angeben.

Nachdem wir nun diese allgemeine Betrachtung in bezug auf die zwei Typen der Aktivität des Virus gemacht haben, wollen wir die charakteristischen Einzelheiten des häufigeren M-Typus eingehender betrachten.

Obwohl sich dieser Typus in sieben Versuchsreihen vorfindet, muß man doch hervorheben, daß sich die sieben Kurven nicht exakt gleichen; diese Kurven sind einander ähnlich, aber nicht identisch; sie sind wie Glieder ein und derselben Familie, welche einerseits ähnliche und gemeinsame, und andererseits eigene besondere Charaktere aufweisen, durch welche sie sich von einander unterscheiden.

So können die verschiedenen Perioden der Abschwächung und des Wiedervirulentwerdens ohne Schwankungen aufeinanderfolgen, wie bei der III. Reihe, oder es kann die eine allmählich in die andere übergehen, wie bei der IV., VI. und X. Reihe; die erste Abschwächung kann kurze Zeit (Versuch II, III, VI, VII), oder, was öfters der Fall ist, 8—12 Stunden dauern (Reihe IV, X, XII); sie kann kaum angedeutet (Reihe II) oder, wie es öfters der Fall ist, sehr ausgesprochen sein (Reihe IV, X). Die zweite Abschwächung ist ausgesprochener als die erste (mit Ausnahme der IV. Reihe). Bei dem zweiten Wiedervirulentwerden der Kultur kann die Virulenz die ursprüngliche anfängliche Höhe der 8. Stunde erreichen, sie kann dieselbe überschreiten (Reihe II, III, IV, VI) oder nicht erreichen (Reihe VII, X, XII). Bei dem ersten Wiedervirulentwerden erreicht die Virulenz fast immer einen höheren Wert, als den ursprünglichen (mit Ausnahme der XII. Reihe); das erste Wiedervirulentwerden ist stets stärker als das zweite.

In dieser Konstanz, bei dem Vorwiegen des M-Typus, des so starken Wiedervirulentwerdens, welche im Parabeltypus fehlt, und in der verhältnismäßigen Häufigkeit (3mal unter 7 Reihen, IV, VI, X), mit der das Wiedervirulentwerden gegen die 20. Stunde beobachtet wird, sind die Gründe zu suchen, welche Tizzoni und Panichi zu der Annahme führten, daß die Pneumokokkenkultur in

besonderer Bouillon gegen die 18.—20. Entwicklungsstunde die größte Aktivität aufweist.

Aus dem Gesagten geht jedoch klar hervor, daß eine eingehendere Untersuchung der mehr oder minder starken Aktivität der Kultur einerseits die Erscheinung bestätigt und andererseits dieselbe besser erklärt und genauer bestimmt. Jedenfalls wird dadurch die Erscheinung nicht in bestimmtere Grenzen gebracht, sondern es wird eine zeitliche Veränderlichkeit für ihr Auftreten nachgewiesen, indem die Erscheinung bald früher, in der 13. Stunde (Reihe II), bald später, in der 22.—24. Stunde (Reihe VI, X, XII) beobachtet wird. Ebenso wird nachgewiesen, daß diese Periode des Wiedervirulentwerdens in den ersten 24 Stunden fehlen kann (Reihe I, V, IX, XI), wie es jedesmal der Fall ist, wo der Verlauf der pathogenen Aktivität des Virus in den ersten 24 Stunden einer parabolischen Kurve entspricht.

Auch bei dem parabelähnlichen Typus ist der Verlauf der pathogenen Aktivität kein konstanter. Obwohl aber hier gewisse Verschiedenheiten beobachtet werden können, besonders in bezug auf die Abschwächung des Virus, welche bald in rasch zunehmender Weise (Reihe XI), bald langsamer (Reihe I) erfolgen kann, zeigen die verschiedenen Momente der Kurve eine größere Regelmäßigkeit und Konstanz, als es, wie wir gesehen haben, bei dem M-ähnlichen Typus der Fall ist. So ist der parabolische Zyklus immer innerhalb der ersten 24—28 Stunden vollendet, und bei dem Wiedervirulentwerden erreicht die Pathogenität des Virus niemals den Wert, welchen sie nach den ersten 8 Entwicklungsstunden aufwies.

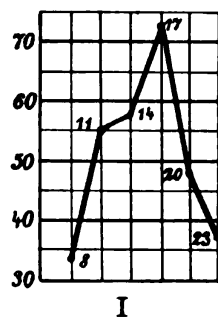
Wenn wir nun den M-ähnlichen Typus mit dem parabelähnlichen in bezug auf die Dauer vergleichen, so geht daraus deutlich hervor, daß der erste sich in einem längeren Zeitraume abspielt als der zweite, obwohl beide zuweilen schon innerhalb der ersten 28 Stunden vollendet sind (Reihe I, II, III, V, VII, IX, XI). Während man aber einwandfrei annehmen kann, daß der Zyklus der pathogenen Aktivität alle seine Phasen durchgemacht hat, auch wenn das Virus, der M-ähnlichen Kurve folgend, zwei Abschwächungen und zwei Reaktivierungen innerhalb der ersten 28 Stunden aufgewiesen hat, kann man dagegen nach unserer Ansicht nicht behaupten, daß der Zyklus vollendet ist, wenn die pathogene Aktivität des Virus innerhalb der ersten 24—28 Stunden eine parabelähnliche Kurve verfolgt hat, denn diese parabelähnliche Kurve könnte die erste Hälfte eines M-ähnlichen Typus mit verlängertem Verlauf darstellen.

So könnte bei den Reihen IV, VI, X, XII die Kurve, welche die Werte des Virus während der ersten 24—26—28 Stunden darstellt, als eine zu dem parabolischen Typus gehörende angesehen werden, wenn man den weiteren Verlauf der Aktivität des Virus außer acht ließe.

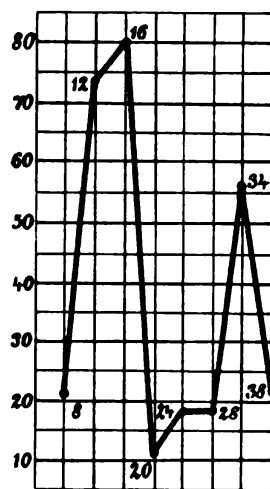
Wir haben dieses hervorgehoben, um unsere Vermutung zu rechtfertigen, als wir annahmen, daß die Beobachtung X bei der 26. Entwicklungsstunde nicht vollendet war. Unsere Annahme wurde auch vollständig bestätigt, was wir hervorheben, um zu erklären, warum wir die Reihen IV, VI, X, XII verlängerten.

Diesbezüglich bleibt uns der Zweifel, daß einige Reihen des parabolischen Typus, besonders diejenigen, welche nicht über die 23. (I. Reihe) resp. 24. Stunde (XI. Reihe) hinaus fortgesetzt wurden, nicht abgeschlossen waren, sondern, bei einer weiteren Beobachtung, einen M-ähnlichen Typus aufgewiesen hätten.

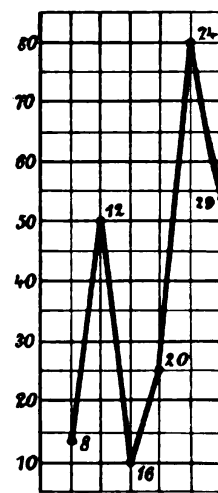
Alle diese Bemerkungen haben wir gemacht, nicht nur um die Tat-



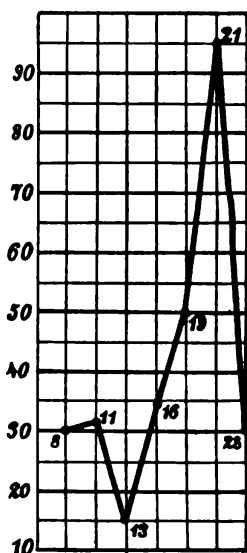
I



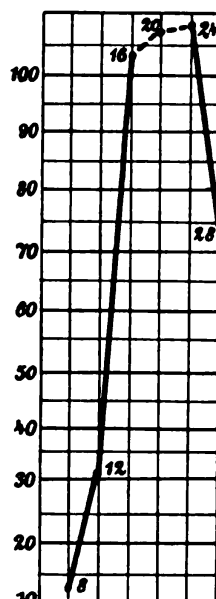
IV



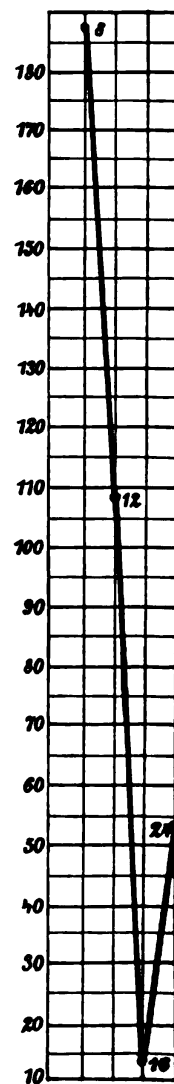
VII



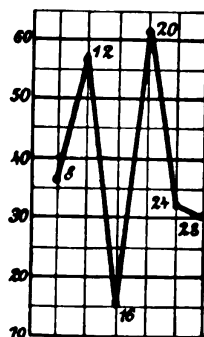
II



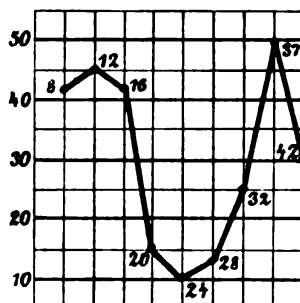
V



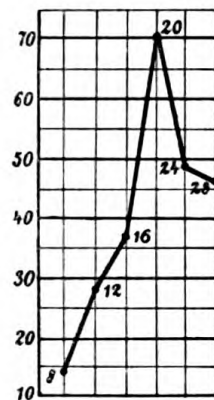
VIII



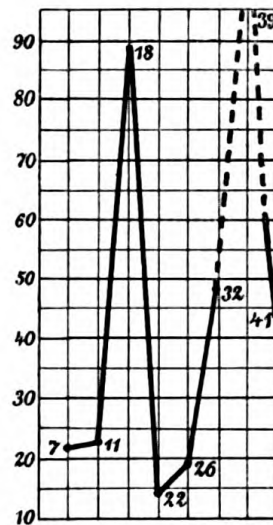
III



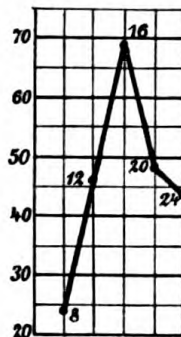
VI



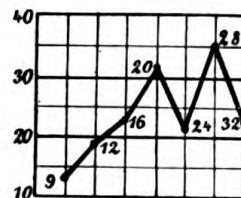
IX



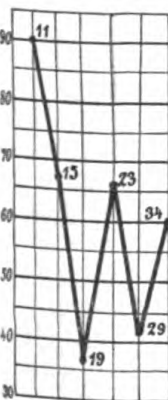
X



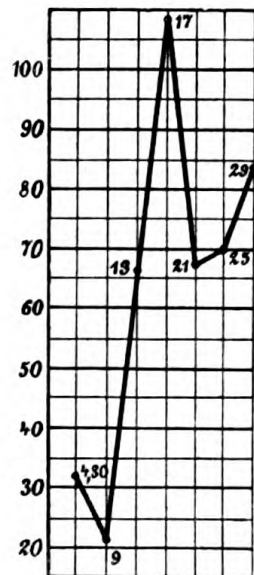
XI



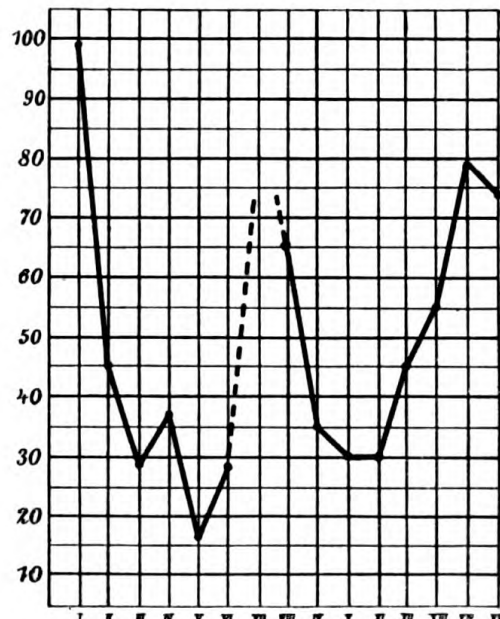
XII



gewöhnliche
Bouillon



Blut



Blut

In allen Diagrammen geben die Ziffern der vertikalen Reihe die Dauer der Krankheit an; die anderen, arabischen oder römischen, entsprechen dem Alter des Virus (in Stunden [arabisch] und in Tagen [römisch]).

sachen zu deuten, sondern um auf die Möglichkeit hinzuweisen, daß der M-Typus häufiger sei, als wie es sich aus unseren 12 Versuchsreihen ergab.

Es schien uns angezeigt, nachdem wir die bisher berichteten Untersuchungen ausgeführt hatten, zu untersuchen, wie sich die pathogene Aktivität des *Pneumococcus* verhält, wenn sich dieses Virus nicht in besonderer, sondern in gewöhnlicher Kulturbouillon und im Blute entwickelt.

Außerdem nahmen wir uns vor, das Verhalten des Blutes zu untersuchen, welches man durch Aderlaß von mit Pneumokokken infizierten Kaninchen gewinnt.

Bei diesen Versuchen haben wir das Virus nach einer anderen Technik bereitet, als wie bei den vorherigen Versuchen. Wir haben zwar denselben Stamm angewendet wie bei diesen, aber die Einpflanzung in Bouillon von normaler Zusammensetzung wurde aus einer 22 Tage alten Mutterkultur in Blut gemacht, da die direkte Einpflanzung unseres in frischem Kaninchenblut entwickelten *Pneumococcus* in gewöhnliche Bouillon einen negativen Ausgang hat.

Die Einpflanzung in frisches Kaninchenblut, um die Entwicklung in diesem Mittel zu verfolgen, wurde aus einer Mutterkultur in besonderer Bouillon ausgeführt.

Deshalb haben wir uns sowohl in dem einen wie in dem anderen Fall unter dieselben Bedingungen gestellt, wie bei den Untersuchungen über den in besonderer Bouillon sich entwickelnden *Pneumococcus*. Andererseits waren die Verhältnisse doch verschieden, weil die Entwicklung des *Pneumococcus* in frischem Blute früher stattfindet, als in der besonderen Bouillon. Im ersten hat 4 Stunden nach der Saat die Vermehrung schon begonnen, in der zweiten beginnt sie erst gegen die 8. Stunde. Noch später beginnt die Vegetation, wenn unser *Pneumococcus* von der Mutterkultur in Blut in gewöhnliche Bouillon eingepflanzt wird.

Durch diese Tatsachen erklärt es sich, warum die Beobachtung, über welche wir jetzt berichten werden, $4\frac{1}{2}$ Stunden nach der Einpflanzung begann, als die pathogene Aktivität des Keimes in frischem Kaninchenblut untersucht wurde, und 11 Stunden nach der Saat begann, als gewöhnliche Bouillon als Nährboden angewendet wurde.

Die zwei Kurven, welche die der pathogenen Aktivität des in frischem Kaninchenblut und in gewöhnlicher Bouillon sich entwickelnden Virus entsprechenden Werte darstellen, zeigen in deutlicher Weise, daß auch in diesen zwei Nährböden der Keim zwei Reaktivierungen und zwei Abschwächungen, ebenso wie in besonderer Bouillon, erfährt, obwohl der Verlauf der vier Phasen demjenigen entgegengesetzt ist, welchen man bei der Kultur in der besonderen Bouillon beobachtet.

In letzterem Kulturboden erfährt das Virus sofort eine Abschwächung, sowohl wenn seine Entwicklung nach dem M-Typus verläuft, als auch wenn sie den parabolischen Typus aufweist. Im frischen Kaninchenblut und in gewöhnlicher Bouillon zeigt das Virus dagegen eine Zunahme an Pathogenität.

Aus diesem Verlauf der Veränderungen der Virulenz des Keimes folgt, daß, obwohl im Laufe der ersten 29 - 34 Stunden die vier Phasen der größeren und geringeren Pathogenität der Kultur beobachtet werden, dieselben eine Kurve bilden, welche man als das negative Bild derjenigen betrachten kann, welche bei den Kulturen in besonderer Bouillon erhalten wurden; d. h. während bei letzterer die Kurve der Form eines

großen M gleicht, bilden die Werte des pathogenen Vermögens des in gewöhnlicher Bouillon resp. in frischem Kaninchenblut entwickelten Virus eine Kurve, deren Form derjenigen eines umgewendeten M [eines W¹⁾] entspricht.

Wir wollen hier nicht andere Einzelheiten der Kurven betrachten, welche wir bei den mit der besonderen Bouillon ausgeführten Untersuchungen betont haben, weil die Untersuchungen mit gewöhnlicher Bouillon und mit frischem Kaninchenblut einzeln sind und uns keine Verallgemeinerung gestatten. Hier wollen wir nur hervorheben, daß der Verlauf, welcher das pathogene Vermögen aufweist, wenn sich der Pneumococcus in gewöhnlicher Bouillon und in frischem Kaninchenblut entwickelt, sich auch wiederholt (der gleiche ist), wenn man tagtäglich während 14 Tagen eine von einem infizierten Kaninchen durch Aderlaß gewonnene Pneumokokkenkultur beobachtet.

Bei dieser Untersuchung gingen wir folgendermaßen vor: Das durch Aderlaß gewonnene und defibrinierte Blut wurde 24 Stunden im Brutschrank und dann bei Zimmertemperatur aufbewahrt. Nach Ablauf der ersten 24 Stunden nach dem Aderlaß wurde eine erste Probemenge des Blutes (0,2 ccm) in die Ohrvenen des Kaninchen eingepflegt; diese Operation wurde dann 14mal wiederholt, mit einem Zwischenraum von einem Mal zum andern von 24 Stunden.

Das Diagramm, welches die Werte der Pathogenität des Virus darstellt, entspricht, wenn man von dem kurzen Teile absieht, welcher einer Reprise der Virulenz am 4. Tage entspricht, in seinem Ganzen einem umgewendeten M. Auch bei dieser Reihe kann die Abschwächung der Kultur einen so ausgesprochenen Grad (in 7 Tagen) erreichen, daß das Versuchstier nicht durch die Einimpfung getötet wird, und diese Tatsache haben wir in der Kurve mit einer punktierten Linie angedeutet, um die Kurve zu vervollständigen, deren Wert dadurch nicht im geringsten Maße beeinträchtigt wird.

Nachdem wir nun Vorliegendes dargetan haben, bleibt noch eine Frage ungelöst. Während wir nämlich annehmen müssen, daß, wie es in Wirklichkeit der Fall ist, die Kraft des Virus eine Aenderung aufweist, auch wenn das Virus vom infizierten Kaninchen durch Aderlaß wiedergewonnen, 14 Stunden bei Zimmertemperatur (als Mutterkultur in Blut) stehen bleibt, wissen wir dagegen uns nicht zu erklären, daß eine Kultur von Pneumokokken in der besonderen Bouillon, in gewöhnlicher Bouillon und in frischem Kaninchenblut ein gleiches Verhalten aufweist, sowohl wenn sie während der ersten 24—48 Stunden ohne Unterbrechung im Brutschrank bleibt, als auch wenn sie während der gleichen Zeitperiode zwar der Zimmertemperatur ausgesetzt wird, aber nicht fortwährend, sondern mit Unterbrechungen, während welcher die Kultur aus dem Brutschrank entfernt und bei Zimmertemperatur gehalten wird.

Zu dieser wiederholt kontrollierten Beobachtung wurden wir dadurch geführt, daß wir den Ueberdruck einschränken wollten, welcher bei unseren Versuchen in den ersten Zeiten durch die Absicht gefordert wurde, die Kultur 24—48 Stunden nacheinander im Brutschrank zu halten und jede 4. Stunde eine Versuchsmenge davon zu entnehmen. Wir konnten so feststellen, daß, sowohl wenn die Kultur die ganze Zeit im Brutofen gehalten wurde, als auch wenn diese Kontinuität dadurch unterbrochen wurde, daß die Kultur während der Nacht vom Brutschrank

1) Bem. des Uebersetzers.

entfernt wurde, die Resultate identisch waren. Die Pathogenität des Virus verhielt sich bald nach dem parabolischen, bald nach dem M-Typus.

Der größeren Genauigkeit halber können wir erklären, daß bei den zwei ersten Reihen von Versuchen mit Kultur in besonderer Bouillon das Virus 24—48 Stunden ununterbrochen im Brutschrank gehalten wurde, während bei allen den übrigen Versuchsreihen sowohl mit Kultur in der besonderen Bouillon wie mit Kultur in den verschiedenen erwähnten Nährböden das Virus während des Tages im Brutschrank und des Nachts außerhalb desselben gehalten wurde.

* * *

Aus den bisher berichteten Tatsachen geht deutlich hervor, daß, wenn man auch nur die Dauer der Krankheit beim Kaninchen betrachtet, eine Pneumokokkenkultur in den verschiedenen Stunden ihrer Entwicklung eine verschiedene Natur, eine verschiedene Beschaffenheit haben muß, wie es auch tatsächlich der Fall ist, und daß sie, je nach den in ihr in den verschiedenen Zeitperioden enthaltenen verschiedenen Substanzen, auch eine verschiedene Wirkung haben muß.

Um dieser logischen Deduktion eine beweiskräftige Begründung zu schaffen, haben wir verschiedene Kriterien verfolgt, welche wir in ihrer Reihenfolge darlegen werden. Es lag uns der Gedanke nahe, den pathologisch-anatomischen Befund von jedem einzelnen Tier in Betracht zu ziehen, um dadurch die eventuellen Beziehungen zwischen den anatomischen Läsionen und dem kulturellen Material festzustellen, welches den Exitus letalis hervorgerufen hatte. Dabei nahmen wir jedoch darauf Rücksicht, daß die Beziehungen zwischen Ursache (Virus) und Effekt (pathologische Veränderungen) durch ein drittes Element beeinflusst werden konnten, nämlich die Konstitution, die individuelle Widerstandsfähigkeit der einzelnen Versuchstiere.

Es ist nämlich bekannt, daß sowohl in der menschlichen, wie in der experimentellen Pathologie infolge der ungleichen Widerstandsfähigkeit der verschiedenen Gewebe, der verschiedenen Organe und der verschiedenen Systeme von Organen ein Virus leichter oder in vorwiegendem Maße auf den einen Teil des Organismus wirkt, als auf den anderen, so daß z. B. eine Infektion mit Eberth'schen Bacillen bei verschiedenen Patienten als Pneumotypus, Meningotypus, Cholotypus, Nephrotypus oder Ileotypus, mit oder ohne Darmblutungen etc. verlaufen kann.

Um bei dieser Reihe von Versuchen die genannte Fehlerquelle möglichst zu vermeiden, haben wir einerseits von den Tieren abgesehen, welche irgendwelche Zeichen von Krankheit (besonders Symptome von Coccidieninfektion) aufwiesen, und andererseits nur diejenigen Tatsachen in Betracht gezogen, welche aus den übereinstimmenden Ergebnissen zahlreicher Beobachtungen hervorgingen.

So beziehen sich unsere Ergebnisse auf mehr als 70 Obduktionen, entsprechend einer gleichen Zahl von Kaninchen, welche bei den elf Versuchsreihen geopfert wurden, auf welche sich folgende Zeilen beziehen. Die einzelnen Resultate haben wir in den zwei folgenden Tabellen dargelegt.

Wir werden jedoch, um über die Beobachtungen in kürzerer Weise zu berichten, unser Augenmerk auf zwei Befunde richten, von denen der eine durch einen entzündlichen Prozeß (Entzündung der serösen Häute), der andere durch einen hämorrhagischen Prozeß charakterisiert ist, und welche beide der menschlichen und experimentellen pneumonitischen

Parabeltypus.

Reihe	Dauer der Krankheit	1. Aktivität	Dauer der Krankheit	Abschwächung	Dauer der Krankheit	Reaktivierung
I	33 Std.	Fibrinös-hämorrhagische Peritonitis. T. 40.	73 Std.	Fibrinöse Peritonitis. Milz dunkelrot, nicht hart, weich.	37 Std.	Punktförmige Hämorrhagieen aus Dünndarm, Wurmfortsatz, Dickdarm, Harnblase. Milz hart, dunkel, arm an Blut. Gelbliche hämatische Flüssigkeit im Abdomen.
V	13 Std.	<i>Peyersche Plaques</i> angeschwollen. — Hämorrhagieen aus Mastdarm und Wurmfortsatz. — Milz hart, arm an Blut. — Septikämie.	103 Std.	Fibrinöse Peritonitis. — Milz v. Weinrotfarbe, reich an Pulpa. — Septikämie. T. 40,5.	75 Std.	Fibrinös-hämorrhagische Peritonitis. — Milz von weinroter Farbe, nicht hart, arm an Blut. — Septikämie. T. 40,9.
IX	14 Std.	<i>Peyersche Haufen</i> angeschwollen. — Hämorrhagieen aus Lunge und Darm. — Milz dunkelrot, arm an Blut. — Septikämie.	70 Std.	Fibrinös-eiterige Peritonitis. — Milz fleischigrot, reich an Blut und Fleisch (Pulpa), weich. T. 40,5.	47 Std.	Fibrinös-hämorrhagische Peritonitis. — Milz v. weinroter Farbe, nicht hart, nicht arm an Blut, starke Septikämie. T. 40,5.
XI	24 Std.	<i>Peyersche Plaques</i> angeschwollen. — Darmhämorrhagieen. — Milz dunkelrot, hart, arm an Blut.	69 Std.	Fibrinös-hämorrhagische Peritonitis. — Milz fleischigrot, reich an Blut und Pulpa. T. 40,5.	44 Std.	<i>Peyersche Haufen</i> angeschwollen. — Milz an einigen Stellen fleischigrot, an anderen dunkelrot, hart, arm an Blut.

M-Typus.

Reihe	Dauer der Krankheit	1. Aktivität	Dauer der Krankheit	1. Reaktivierung
III	36 Std.	Fibrinös-hämorrhagische Peritonitis — Milz weinrot, nicht hart. Aeusserst schwere Septikämie. T. 41,1.	15 Std.	<i>Peyersche Plaques</i> angeschwollen. — Milz von weinroter Farbe, arm an Blut. — Mittelmäßige Septikämie.
IV	21 Std.	<i>Peyersche Plaques</i> angeschwollen. — Mastdarm-, Darm- u. Lungenblutungen. — Milz dunkelrot, hart, arm an Blut. — Septikämie. T. 40,8.	11 Std.	<i>Peyersche Plaques</i> angeschwollen. — Hämorrhagieen aus Wurmfortsatz und Lunge. — Milz dunkelrot, arm an Blut. — Septikämie.
VI	13 Std.	Hämorrhagieen aus Wurmfortsatz, Lunge und Thymus. — Milz dunkelrot, arm an Blut. — Septikämie. T. 40,1.	10 Std.	Hämorrhagieen aus Darm, Wurmfortsatz u. Mastdarm. — <i>Peyersche Plaques</i> angeschwollen. — Milz dunkelrot, arm an Blut. — Septikämie.
VII	13 Std.	<i>Peyersche Plaques</i> angeschwollen. — Hämorrhagieen aus Darm. — Milz dunkelrot, hart, arm an Blut. — Septikämie.	10 Std.	<i>Peyersche Plaques</i> angeschwollen. — Milz rot, fleischig, nicht hart, nicht reich an Blut. — Schwere Septikämie.

Reihe	Dauer der Krankheit	1. Aktivität	Dauer der Krankheit	1. Reaktivierung
X	22 Std.	<i>Peyersche Plaques angeschwollen. — Hämorrhagien aus dem ganzen Darmtraktus. — Milz dunkelrot, hart, arm an Blut. — Septikämie. T. 40,5.</i>	14 Std.	<i>Peyersche Plaques angeschwollen. — Hyperämie des Darmes. — Milz fleischigrot. — Schwere Septikämie.</i>
XII	33 Std.	<i>Hämorrhagien aus Darm und Lungen. — Milz vergrößert, dunkelrot, arm an Blut.</i>	21 Std.	<i>Peyersche Plaques angeschwollen und hyperämisch. — Milz rosig.</i>
II	30 Std.	<i>Fibrinöse Peritonitis. — Milz hart, weinrot. T. 39,2.</i>	16 Std.	<i>Fibrinös-hämorrhagische Peritonitis. — Milz weinrot, hart, arm an Blut.</i>

Reihe	Dauer der Krankheit	2. Abschwächung	Dauer der Krankheit	2. Reaktivierung
III	61 Std.	<i>Fibrinöse Peritonitis. — Peyersche Haufen angeschwollen. — Milz weinrot, nicht hart. — Septikämie. T. 40,1.</i>	30 Std.	<i>Fibrinöse Peritonitis. — Peyersche Plaques angeschwollen. — Milz fleischigrot, hart, arm an Blut. — Septikämie. T. 40,2.</i>
IV	56 Std.	<i>Fibrinöse Peritonitis. — Milz dunkelrot, arm an Blut. — Septikämie. T. 40,1.</i>	21 Std.	<i>Fibrinöse Peritonitis und Pleuritis. — Milz dunkelrot, reich an Blut.</i>
VI	49 Std.	<i>Peyersche Haufen angeschwollen. Hämorrhagien aus Darm und Wurmfortsatz. — Milz dunkelrot, hart, arm an Blut. T. 41.</i>	31 Std.	<i>Peyersche Haufen angeschwollen. — Schwere Darmhämorrhagien. — Milz dunkelrot, hart, arm an Blut. — Schwere Septikämie.</i>
VII	80 Std.	<i>Fibrinös-eiterige Peritonitis u. Pericarditis. — Milz dunkelrot, nicht hart, reich an Blut und Fleisch. — Geringfügige Septikämie.</i>	54 Std.	<i>Fibrinös-hämorrhagische Peritonitis. — Anschwellung der meseraischen Lymphknoten. — Milz dunkelrot, reich an Blut. — Septikämie.</i>
X	47 Std.	<i>Peyersche Haufen angeschwollen. — Milz dunkelrot, nicht hart, mit viel Pulpa. — Schwere Septikämie. T. 39,6.</i>	44 Std.	<i>Peyersche Haufen angeschwollen. — Lungen- und Darmblutungen. — Milz dunkelrot, hart, arm an Pulpa. — Septikämie. T. 40,0.</i>
XII	35 Std.	<i>Fibrinöse Peritonitis. — Milz dunkelrot, reich an Fleisch.</i>	23 Std.	<i>Hyperämie und Anschwellung der Peyerschen Haufen. Milz rosig.</i>
II	96 Std.	<i>Fibrinöse Peritonitis. — Milz weinrot. T. 40,1.</i>	30 Std.	<i>Fibrinöse Peritonitis. — Milz weinrot, hart, arm an Blut. — Septikämie.</i>

Infektion gemein sind, obwohl der erste mehr den Krankheitsformen mit langsamem Verlauf, der zweite dagegen denjenigen mit rapider Evolution entspricht.

Wir wollen jedoch gleich hervorheben, daß der Unterschied im Prozeß, wie wir später noch betonen werden, auf einen anderen Faktor als die Dauer der Krankheit zurückgeführt werden muß.

Im anatomisch-pathologischen Befunde der Kaninchen, welchen Kulturen des parabelähnlichen Typus eingepflegt wurden, beobachtete

man, sowohl in der anfänglichen Periode der Vegetation, wie am Ende der Parabel, d. h. nach 24—48 Stunden, keine vorwiegende Häufigkeit des einen oder des anderen der erwähnten krankhaften Prozesse; es war mit annähernd gleicher Häufigkeit bald der entzündliche (Peritonitis), bald der hämorrhagische Prozeß (Darmblutung usw.) zu beobachten.

Dagegen ist in der Abschwächungsperiode (am Gipfel der Parabel) konstant ein entzündlicher (fibrinöser, fibrinös-eiteriger und fibrinös-hämorrhagischer) Prozeß vorhanden.

Diese konstante Erscheinung gegen die 16.—20. Stunde der Entwicklung weist darauf hin, daß die Kultur zu dieser Zeit besondere Eigenschaften besitzt, verschieden von denjenigen, welche sie vorher und nachher in einem niedrigeren und höheren Alter aufweist. Man muß aber auch noch hervorheben, daß man, während die Häufigkeit der zwei Prozesse (der entzündliche und der hämorrhagische) am Anfang und am Ende der Parabel in den vier Reihen annähernd die gleiche ist, die Charaktere der Kultur in den zwei Altern nicht als gleich ansprechen kann. Man kann nämlich in der Reaktivierung den hämorrhagischen Befund haben, während dieser am Anfang und in der Abschwächung (Reihe I) fehlte, wo er am Anfang vorhanden war und durch den entzündlichen Prozeß in der Abschwächungsperiode ersetzt wurde (Reihe XI); ebenso kann man in der Reaktivierung Entzündungen der serösen Häute beobachten, während am Anfang die Kultur hämorrhagische Erscheinungen hervorruft (Reihe V und IX). Bei diesem fortwährenden Sich-ändern der kulturellen Eigenschaften bleibt das entzündungserregende Vermögen des Virus während der Abschwächungsperiode konstant.

Nicht weniger unbeständig sind die pathogenetischen Eigenschaften der Pneumokokkenkultur, wenn diese in ihrer Entwicklung den M-ähnlichen Typus aufweist. Auch hier kann man jedoch Erscheinungen nachweisen, welche mit eigenen Charakteren verlaufen.

Während sowohl in der 8. Entwicklungsstunde wie in der II. Abschwächung der entzündliche Prozeß mit dem hämorrhagischen abwechselt, prädominiert dieser deutlich in der ersten Periode (5mal unter 7), während der jener in der Periode der II. Abschwächung vorherrscht (5mal unter 7). Die Häufigkeit des einen im Verhältnis zum anderen ist genau umgekehrt. Auch in der II. Reaktivierung beobachtet man die zwei Arten von anatomischen Läsionen in abwechselnder Weise, mit einem leichten Vorherrschen der Phlogose im Vergleich zur Hämorrhagie (4:3).

Dagegen bleibt das pathogene Vermögen des Virus konstant in der Periode der ersten Virulenzzunahme, in welcher, mit Ausnahme eines einzigen Falles, immer der entzündliche Prozeß fehlt, während in mehr oder minder ausgesprochener Weise Gefäßläsionen (Hyperämie, Hämorrhagie) auftreten.

Eine Tatsache, welche nie bei den Versuchen mit dem Virus des parabolischen Typus beobachtet wurde, dagegen aber bei dem M-ähnlichen Typus auffiel, ist folgende: Daß bei diesem letzten die Kultur zweimal (Reihe II, VI) in den verschiedenen Perioden von Abschwächung und Reaktivierung immer die Eigenschaft behielt, entweder den entzündlichen (Reihe II) oder den hämorrhagischen (Reihe VI) Prozeß hervorzurufen.

Und doch war in diesen zwei Reihen die Dauer der Krankheit je nach den verschiedenen und einem verschiedenen Alter derselben Kultur entsprechenden Virusentnahmen so verschieden, daß die Dauer der durch das Virus der Abschwächungsperiode hervorgerufenen Krankheit 5—6mal

länger war als diejenige der Krankheit, welche der ersten Reaktivierung der Kultur entsprach. Diese Beobachtung legt die Annahme nahe, daß sich bei diesen Kulturen die Eigenschaften des Virus geändert haben, ohne daß der pathologisch-anatomische Befund diese Änderungen angezeigt hat. Man darf bei der Gleichmäßigkeit des nekroskopischen Befundes nicht die durch einen bis jetzt unbekannten Faktor bedingte Veränderung der Kultur in Abrede stellen.

Bevor wir zur Darlegung von weiteren Ergebnissen anderer Natur schreiten, wollen wir, immer in bezug auf den nekroskopischen Befund, zwei Elemente hervorheben, welche nach unserer Ansicht einer Erörterung würdig sind.

Auf das eine haben wir schon beiläufig hingewiesen, nämlich, daß das Auftreten des einen oder des anderen der zwei Prozesse, d. h. des entzündlichen oder des hämorrhagischen, nicht von der Dauer der Krankheit oder nur von derselben abhängig ist. Man kann nämlich Hämorrhagien beobachten, wenn der krankhafte Prozeß bis in die 49. Stunde (Reihe VI) und die 44. Stunde (Reihe X, XI) hinaus dauert, und kann Peritonitis auch bei Kaninchen beobachten, welche bereits nach 16 (Reihe II) oder 21 Stunden (Reihe IV) starben. Bei Abwesenheit dieser Befunde hätte man annehmen können, daß die Häufigkeit der bei Anwendung von Virus der Reaktivierungsperiode (M-Typus) beobachteten hämorrhagischen Erscheinungen und diejenige der bei Anwendung von abgeschwächtem Virus (Parabeltypus) nachweisbaren entzündlichen Erscheinungen mit der verschiedenen Dauer der Krankheit zusammenhinge.

Ein letztes Element, welches aus den nekroskopischen Befunden hervorgeht, bezieht sich auf den verschiedenen Zustand, in dem sich die Milz befand, je nachdem das Kaninchen mit entzündlichen oder hämorrhagischen Veränderungen gestorben war. Im ersten Fall wies die Milz keine bedeutende Zunahme an Volumen auf; sie zeigte eine rote Farbe verschiedenen Grades, bald weinrot, bald dunkelrot, und eine normale oder gesteigerte Weichheit, war reich an Fleisch (Pulpa) und an Blut, öfter an Fleisch als an Blut. In den Fällen dagegen, wo das Kaninchen mehr oder minder zahlreiche, mehr oder minder schwere, und mehr oder minder ausgedehnte Hämorrhagien (im Darne, in den Lungen, in der Thymus) aufwies, war die Milz beträchtlich vergrößert, und zeigte eine fleischigrote oder eine dunkle rötlich-braune, an ein Blutgerinnsel erinnernde Farbe. Die Konsistenz des Organs war bedeutend erhöht; auf der Schnittfläche konnte man weder Pulpa noch Blut herauspressen, dagegen erschien das Milzgewebe oft friabel (bröckelig).

Diese Notizen werden denjenigen, welche die Arbeit von Foà (6) gelesen haben, in der er über seine Untersuchungen über *Pneumococcus* berichtete (1893), die Kriterien ins Gedächtnis zurückrufen, welche nach diesem Autor dienen, um die ödematogene Varietät des hier in Frage stehenden Keimes von der fibrinogenen zu unterscheiden. Foà schrieb eben dieser zweiten Varietät die Eigenschaft zu, einen harten Milztumor hervorzurufen, während im Falle der Einwirkung der ersten Varietät ein weicher Stauungstumor der Milz entsteht.

Man könnte also annehmen, daß derselbe Keim, je nach seiner Aktivität, welche in den verschiedenen Perioden seiner Entwicklung in einer Kultur von 24—48 Stunden verschieden ist, die Eigenschaften der einen oder der anderen dieser zwei Varietäten annehmen kann, welche man bis jetzt von dem Fränkelschen *Pneumococcus* hat unterscheiden wollen.

Es soll uns genügen, diese Tatsache hervorgehoben zu haben, in dessen erwarten wir weitere Untersuchungen darüber, und besonders mikroskopische Untersuchungen (welchen Dr. Porrini gegenwärtig seine ganze Tätigkeit widmet).

Nachdem wir nun sowohl durch Betrachtung der Dauer der Krankheit, wie durch pathologisch-anatomische Untersuchung der entsprechenden Kaninchen die Aenderungen deutlich nachgewiesen hatten, welche das in der besonderen Bouillon kultivierte Virus während der ersten 24—48 Stunden fortwährend erfährt, haben wir ein anderes Kriterium angewendet, um diese verschiedene Natur des Virus zu prüfen, nämlich das vakzinische Kriterium.

Die diesbezüglichen Untersuchungen wurden folgendermaßen ausgeführt: Es wurden mehrere Kaninchen annähernd des gleichen Gewichtes in 4 Gruppen geteilt, welche wir der Kürze halber mit A, B, C, D bezeichnen werden. Jede Gruppe bestand aus zwei Kaninchen, ausnahmsweise aus drei, aus Gründen, die wir weiter unten angeben werden. Für die erste Gruppe (A) wurde als Vacciniermaterial das Virus von der 8. Entwicklungsstunde angewendet, für die zweite (B) dasjenige der ersten Reaktivierung, für die dritte (C) die Kultur in der Periode der zweiten Abschwächung, und für die vierte (D) das Virus der zweiten Aktivierung. Wir nahmen von einer fünften Kategorie Abstand, welche einer Vakzinierung mit Material aus der ersten Abschwächung hätte entsprechen können, weil diese Erscheinung zuweilen so kurzdauernd und so geringfügig war (Reihe II, VI), daß sie nicht eine charakteristische und so konstante Erscheinung darstellte, wie die übrigen Phasen derselben Kultur vom M-Typus.

Es wurden auch keine Vaccinierungsversuche angestellt mit Virus, des parabolischen Typus, weil hier die Aktivität des Keimes im allgemeinen viel geringer war. Die von einem von uns unter der Leitung des großen Meisters der Serotherapie, Prof. Tizzoni, ausgeführten Forschungen veranlaßten uns dazu, zur Vakzination das stärkste Virus zu wählen. Auch waren es die früheren Unterweisungen von Tizzoni (Institut f. allgem. Pathol., Bologna), welche uns dazu veranlaßten, bei unseren gegenwärtigen Untersuchungen die Methode anzuwenden, welche Tizzoni-Panichi bei ihren diesbezüglichen Untersuchungen beschrieben haben (7). So haben wir gleichzeitige endovenöse Einspritzungen von Heilserum und von Virus gemacht, um die Grundimmunität zu erzielen; dann haben wir wiederholt Verstärkungsinjektionen gemacht, und zwar entweder mit einem Zwischenraum von 10—12 Tagen, oder bei Verschwinden der Reaktionserscheinungen, welche das Tier bei der vorigen Verstärkung gezeigt hatte. Jede Verstärkung erfolgte auf intravenösem Wege, mit 0,2 ccm Virus mehr als bei der vorigen Einspritzung, mit Ausnahme der Probeeinspritzung, bei welcher das Virus in der ursprünglichen Menge von 0,2 ccm, aber ohne Serum eingespritzt wurde.

Selbstverständlich wurde bei jeder Kategorie zu den Verstärkungen immer dasselbe Virus angewendet, welches zur fundamentalen Vakzination gedient hatte.

Obwohl wir unsere Beobachtungen noch nicht als vollendet betrachten, können wir schon sagen, daß die von uns erhaltenen Resultate von einer unbestreitbaren Evidenz sind.

Unsere Beobachtungen sind nicht vollendet, weil wir uns vorgenommen haben, eine Verstärkung zu erreichen, welche einer Dosis von 1,2 ccm Virus bei der letzten Einspritzung entspricht; diese Dosis erwies

sich schon durch frühere Untersuchungen von Tizzoni und Panichi als die beste.

In der Kategorie A (Vaccination mit 8 Stunden altem Virus) wurden die Tiere durch die Behandlung geschädigt, und zwei davon starben drei Tage nach der Probeeinspritzung an fibrinöser Peritonitis; der pathologisch-anatomische Befund war bei beiden gleich, ebenso wie die Dauer der Krankheit und der gegen die Vaccination geleistete Widerstand dieselben waren.

Ein drittes Kaninchen hat bis zur fünften Verstärkung widerstanden, nachdem es infolge der Probeeinspritzung an einer schweren Infiltration im Unterhautgewebe des Ohres und infolge der zweiten Verstärkung an einer Infiltration im Bauchunterhautgewebe gelitten hatte. Infolge dieser vom Tiere gezeigten Leiden wurde die Zahl der Versuchstiere von zwei auf drei erhoben.

Die Kaninchen, welche der Vaccination mit Virus aus der 1. Aktivierung unterzogen wurden (B), wurden keineswegs geschädigt; sie sind gegenwärtig noch lebend und gesund, und sind bei der 5. Verstärkung.

Von den Kaninchen, welche mit Virus von der der II. Abschwächung entsprechenden Entwicklungsperiode behandelt wurden (C), litt das eine nach der 3., und das andere nach der 4. Verstärkung an Fieber, und während das erste 3 Tage nach der 4. Verstärkung an einer serös-fibrinösen Bauchfellentzündung starb, hat das zweite infolge der 5. Verstärkung schleimig-serös-blutiges Material aus dem Mastdarme entleert.

Die Vaccination mit Virus der II. Reaktivierung (D) hatte äußerst schwere Folgen, und alle die drei damit behandelten Kaninchen gingen zugrunde.

Das erste derselben starb infolge der fundamentalen Vaccination, mit Lokalisierung des Virus im abdominalen Unterhautgewebe; das zweite überlebte die Probeeinspritzung 5 Tage, und wies eine fibrinöse Peritonitis auf; das dritte konnte bis zur 3. Verstärkung leben, ging aber 3 Tage danach mit Symptomen von Enteritis zugrunde.

Wenn wir nun die Ergebnisse unserer Vaccinationsversuche zusammenfassen, können wir sagen, daß das 8 Stunden alte Virus (am Anfang seiner Entwicklung) nicht sehr gute Resultate liefert (1 Erfolg unter 3), daß das Virus der 1. Reaktivierung gute Dienste leistet, daß die mit Virus der II. Abschwächung erhaltenen Resultate mittelmäßig waren, und daß die Behandlung mit Virus der II. Reaktivierung unheilvolle Folgen hatte.

Wir fügen jedoch sofort hinzu, daß dieses unser Urteil nicht als absolut gelten kann, in Anbetracht der geringen Zahl der von uns bei diesen Versuchen angewendeten Tiere. Wir glauben jedoch, zur Annahme berechtigt zu sein, daß unsere Untersuchungen uns nichtsdestoweniger wichtige Anhaltspunkte für weitere Forschungen geliefert haben.

Das die Vaccinationsmethode, die „gemischte Methode“, in bezug auf die fundamentale Immunität die richtige war, wie übrigens schon durch die Untersuchungen von Tizzoni und Panichi nachgewiesen war, beweist die Tatsache, daß infolge dieser Behandlung kein Kaninchen zugrunde ging, mit Ausnahme von einem aus der Kategorie D (welche wir als unheilvoll bezeichneten).

Deshalb muß das Resultat der Vaccination in direkte Beziehung mit dem Material gestellt werden, welches bei den einzelnen Einspritzungen angewendet wurde.

So liefern die verschiedenen Resultate, welche bei Anwendung der

verschiedenen Tiere erhalten wurden, einen neuen Beweis dafür, daß die pathogenen Eigenschaften einer Pneumokokkenkultur sich in den verschiedenen Altersperioden dieser letzteren ändern.

Diese Schlußfolgerung wurde, wie bereits gesagt, durch die verschiedene Dauer der Krankheit der Kaninchen, welchen das Virus einer und derselben Kultur, aber in verschiedenem Alter, injiziert wurde, und durch den verschiedenen entsprechenden anatomischen Befund in beweiskräftiger Weise begründet. So führen drei Kriterien, das pathogene, das pathologisch-anatomische und das vaccinische, auf verschiedenem Wege übereinstimmend zu der Annahme einer fortwährenden Umwandlung einer Pneumokokkenkultur in ihren ersten 24—48 Entwicklungsstunden.

Vielleicht wird uns ein viertes Kriterium durch serotherapeutische Versuche geliefert werden können; wir haben uns vorgenommen, solche auszuführen, und zwar mit Blutserum der vaccinierten und am Leben gebliebenen Kaninchen. Wir können schon anzeigen, daß man Änderungen der Qualität der Kultur durch chemische Untersuchungen nachweisen kann (mit welchen einer von uns [Panichi] beschäftigt ist).

* * *

Nachdem wir nun durch unsere Untersuchungen, welche nach verschiedenen Richtungen ausgedehnt wurden, wertvolle Resultate lieferten und zu übereinstimmenden Schlußfolgerungen führten, bis zu diesem Punkte angelangt sind, fühlen wir uns nicht dazu berechtigt, eine Meinung auszusprechen in bezug auf die Deutung des Mechanismus, welcher die Änderungen der pathogenen Aktivität des Pneumococcus während der ersten 24—48 Stunden seiner Entwicklung in der besonderen Bouillon regelt.

Wir möchten jedoch eine Tatsache hervorheben, nämlich die, daß die verschiedene Kraft des Virus, welches auch ihr Grad sei, abgeschwächt oder gesteigert, nicht auf das bakterische Element, als Quantität und nicht als Qualität betrachtet, zurückgeführt werden kann. Denn wenn die Aktivität des Virus von der Zahl der Keime abhinge, wüßte man sich nicht seinen hohen Wert am Anfange zu erklären, wo die Keime weniger zahlreich sind, seine darauffolgende Abschwächung, wenn sich die Keime vermehrt haben, und die Reaktivierung derselben Kultur zuletzt, wenn die Zahl der Bakterien, nach den 24—48 Stunden, infolge einer Autolyse der Keime selbst, nötigerweise abnehmen muß.

Wenn wir also einen quantitativen Einfluß des Keimes in Abrede stellen, erhellt aus dem Gesagten, daß eine größere Bedeutung den chemischen Stoffen der Kultur zukommt, sei es, daß diese Stoffe vom Pneumococcus ausgesonderte Gifte oder Produkte des Zerfalls der Bakterienkörper darstellen.

Für diese Annahme, welche schon seit langer Zeit Tizzoni und Panichi betont haben (5), sprechen in indirekter Weise die Ergebnisse aller unserer gegenwärtigen Untersuchungen, welche wir durch folgende Sätze zusammenfassen können:

1) In den Kulturen von Pneumokokken in der besonderen Bouillon weist die pathogene Aktivität während der ersten 24—48 Stunden der Entwicklungsperioden von wechselnder Intensität auf.

2) Die wechselnde Aktivität kann nach einer parabolischen Kurve verlaufen; ihr Verlauf entspricht jedoch häufiger einer Kurve, welche einem großen M gleicht.

3) Zwischen den Abschwächungen und den Reaktivierungen des Virus beobachtet man äußerst häufig eine Periode von maximaler Aktivität, deren Eintrittszeit zwischen der 13. und der 24. Stunde schwankt.

4) Die biologischen Untersuchungen, die pathologisch-anatomischen Befunde und die Vaccinationsresultate beweisen die wechselnde pathogene Aktivität der Kultur.

Literatur.

- 1) Emmerich, Ueber die Infektion, Immunisierung und Heilung bei croupöser Pneumonie. (Zeitschr. f. Hyg. 1894. p. 167—184.)
- 2) Bunzl-Federn, Emil, Ueber Immunisierung und Heilung bei der Pneumokokkeninfektion. (Arch. f. Hyg. 1894.)
- 3) Besson, *Tecnica microbiologica e sieroterapica*. Italienische Uebersetzung von E. Bertarelli. Torino (Unione Tipografico-Editrice Torinese) p. 147.
- 4) Sclavo, Della coltura di diplococco di Fränkel nelle uova. (Rivista d'Igiene pubblica. 1894.)
- 5) Tizzoni e Panichi, Vaccinazione, immunità, sieroterapia contro lo pneumococco di Fränkel. (Archivio di farmacologia sperimentale e scienze affini. 1903.)
— —, Memorie della R. accad. delle scienze dell'Istituto di Bologna. Serie V. T. X.
- 6) Foà, P., Sull'infezione da diplococco lanceolato. (Arch. per le scienze mediche. Vol. XVII. No. 18. p. 386.)
- 7) Tizzoni e Panichi, Vaccinazione, immunità, sieroterapia contro lo pneumococco di Fränkel. (Mem. R. accad. delle scienze dell'Istituto di Bologna. Serie V. T. X.)
— —, Alcune indicazioni pratiche per la preparazione del siero antipneumonico. (Ibid. Serie VI. T. III. 1906.)

Nachdruck verboten.

Ursache des Todes bei dem akuten Milzbrande.

Von Dr. Nic. Strueff, Moskau.

Mit 9 Figuren.

Prof. Levy und Z. Beckmann¹⁾ haben in letzter Zeit einen neuen Versuch gemacht, um das wahre Toxin des Milzbrandes zu entdecken. Die genannten Verff. entnehmen den infizierten Tieren in der Periode der Agonie Blut aus der Carotis und spritzten sodann das erhaltene Blutserum den zum Experiment gebrauchten Tieren, etwa in einer ihrem eigenen Blutserum entsprechenden Menge, unter die Haut ein. Dabei meinten die Verff., daß in dem ganzen Blutserum (also auch im Blute) des an Milzbrand sterbenden Tieres diejenige Menge des Toxins enthalten sei, welche sehr nahe an die tödliche Dosis grenzt. Jedoch auch diese Versuche, das Toxin des Milzbrandes zu erhalten, schlugen fehl. Die genannten Verff. behaupteten auf Grund ihrer Experimente, daß „die Bacillen des Milzbrandes keine giftigen Stoffwechselprodukte im wahren Sinne des Wortes bilden, welche in das Blutserum übergehen können“.

Somit bleibt die Frage der Pathogenese des Milzbrandes bis jetzt noch streitig und ist noch bei weitem nicht aufgeklärt. Im Jahre 1877 sprach Toussaint²⁾ die Meinung aus, welche er zwar nicht durch vielfache, jedoch sorgfältig ausgeführte Versuche bekräftigen wollte, daß

1) Levy u. Beckmann, Sind im Blutserum von mit Schweinepest und Milzbrandbacillen tödlich infizierten Kaninchen wirksame oder giftige Stoffwechselprodukte nachweisbar? (Centralbl. f. Bakt. etc. Abt. I. Orig. Bd. XLIII. 1906.07. p. 43—47.)

2) Toussaint, Du mécanisme de la mort consécutive à l'inoculation du charbon au lapin. (Compt. rend. de l'Acad. 1877.) — Théorie de l'action des bactéries de charbon. (Compt. rend. de l'Acad. 1878.)

„der Tod an Milzbrand beim Kaninchen die Folge der Verstopfung der Lungenkapillaren und die Erstickung Folge einer mechanischen Ursache seien“. Toussaint sagt übrigens in seinen weiteren Arbeiten, daß außer der mechanischen Ursache in einigen Fällen, besonders bei Tieren von geringerer Empfindlichkeit gegen Milzbrand, noch die Wirkung einer besonderen phlogogenen Substanz hinzukomme. Diese Theorie fand keine besondere Zustimmung unter den Vertretern der Wissenschaft und ist bis jetzt fast ignoriert worden, abgesehen von den Erwiderungen von Strauss, Nocard und einiger anderer Verff., welche nur die einzelnen Details dieser Theorie berührten.

Im Gegensatz zu der mechanischen Theorie von Toussaint sahen O. Bollinger¹⁾, Pasteur²⁾ u. a. den Hauptgrund der schweren Erscheinungen und des Todes beim Milzbrande in der Unterbrechung der Oxydationsprozesse im Organismus, da die Bakterien des Milzbrandes, als Aëroben, den roten Blutkörperchen den Sauerstoff entziehend, auf diese Weise den normalen Gaswechsel hindern.

Aber schon bald nach dem Aufstellen dieser Theorie haben viele Verff., wie Klebs³⁾, Virchow⁴⁾, Oemler u. a. derselben mit vollem Rechte widersprochen, indem sie darauf aufmerksam machten, daß das Blut der an Milzbrand gefallenen Tiere oft nur eine geringe Bakterienmenge enthält, mit deren Gegenwart die schweren Erscheinungen des Sauerstoffhungers nicht recht zu erklären sind; außerdem sind die Oxydationsprozesse im Körper der vom Milzbrand behafteten Tiere nicht vermindert, wie es beim Zulassen der Möglichkeit der Sauerstoffentziehung durch die Bakterien zu erwarten wäre.

Mit der Entwicklung der Toxinlehre entstanden vielfache Versuche, auch beim Milzbrande ein ähnliches Toxinprodukt aufzufinden, mit dessen Wirkung der ganze Komplex dieser Infektionserscheinungen zu erklären wäre. — Conradi⁵⁾ hat eine ausführliche Geschichte des Suchens nach dem Milzbrandtoxin gegeben und beweist, daß das echte, starkwirkende und spezifische Toxin durch keine der bekannten Methoden zu erhalten ist.

Ich wollte daher in meiner Arbeit durch Versuche möglichst diejenigen Seiten dieser Frage aufklären, welche von den übrigen Autoren verhältnismäßig wenig bearbeitet worden sind.

Bezüglich der Ausscheidung des Toxins des Milzbrandes in vitro begann ich meine Arbeit mit der Analyse der klinischen Erscheinungen und mit dem Studium der Verteilung der Bakterien in den verschiedenen Organen. Ich hoffte, vermittelst dieser Methode der Lösung der Frage, welches Organ am meisten von der Milzbrandinfektion in Mitleidenschaft gezogen wird, näherzutreten.

Wenn in der Tat nicht die Toxine, sondern die Bakterien selbst als fremde Körper die Erkrankung hervorrufen, so kann deren Verteilung in den Organen als Kennzeichen dienen, welches von ihnen am meisten leidet. Es ist ganz gleich, ob die Organe durch die Toxine oder die Anwesenheit der Bakterien selbst leiden, da die Krankheitserscheinungen in denselben mit Hilfe der Methoden der pharmakologischen Analyse

1) Bollinger, O., Infektionen durch tierische Gifte. Zoonosen. (Handb. d. spez. Path. u. Ther. H. v. Ziemssen. p. 506.)

2) Pasteur, L., Charbon et septicémie (en commun avec Joubert.) (Compt. rend. de l'Acad. des sciences. 1877.)

3) Klebs, Note sur la cause du charbon. (Compt. rend. de l'Acad. 1877.)

4) Virchow, Fortschritte der Kriegsheilkunde. 1874.

5) Conradi, H., Zur Frage der Toxinbildung bei den Milzbrandbakterien. Zeitschr. f. Hyg. Bd. XXXI. 1899.)

untersucht werden können, um so zu ersehen, welches Organ, dessen Funktionsstörung unmittelbar den Tod herbeiführt, am schwersten mitgenommen wird.

Zu den Versuchen wurden ausschließlich Kaninchen gebraucht.

Bei der akuten experimentellen Form des Milzbrandes dauerte der Krankheitsprozeß 28—49 Stunden. Schwere Erscheinungen (arge klonisch-tonische Krämpfe) stellten sich fast plötzlich ein und führten rasch zum Tode.

Bei der verzögerten Form des Milzbrandes währte der Prozeß 90 Stunden und darüber. Oft hatte das Tier schon lange vor dem letalen Ausgange ein krankhaftes Aussehen, und fraß schlecht.

Besonders scharf unterscheidet sich die akute Form des Milzbrandes von der verzögerten durch die Anzahl der Bakterien in den verschiedenen Organen.

Bei der akuten Form des Milzbrandes ist von vornherein besonders die enorme Bakterienzahl in den Lungen, im Vergleich zu den übrigen Organen auffallend, was schon früher von Toussaint betont worden ist. Bei der verzögerten Form des Milzbrandes ist im ganzen die Anzahl der Bakterien in den Organen nicht groß und zeigt keinen großen Unterschied für die verschiedenen Organe.

Zur besseren Uebersicht lasse ich hier eine graphische Tabelle zum Vergleiche der Anzahl der in den Organen verteilten Bakterien bei der akuten und der verzögerten Form des Milzbrandes folgen, welche auf Grund meiner Versuche zusammengestellt ist (s. Fig. 1 u. 2).

Die Bakterienmenge in den Lungen im ersten Fall (akute Form) ist vollständig genügend, wie unsere Versuche mit der künstlichen Embolie der Lungen mittels der Milzbrandbakterien bestätigten, um den letalen Ausgang hervorzurufen.

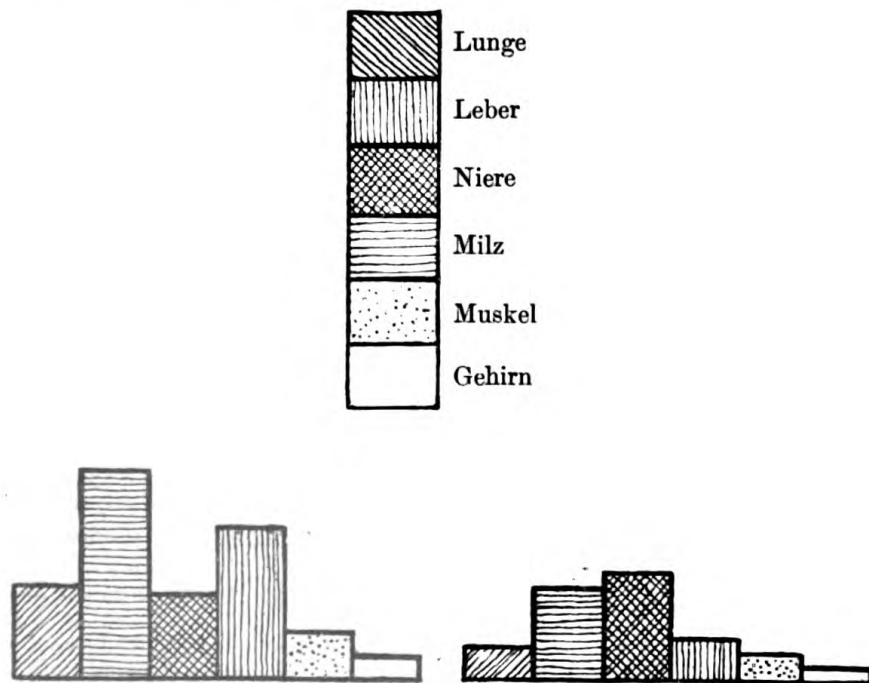


Fig. 1. Das Verhalten der Bakterien in den Organen bei der verzögerten Form des Milzbrandes.

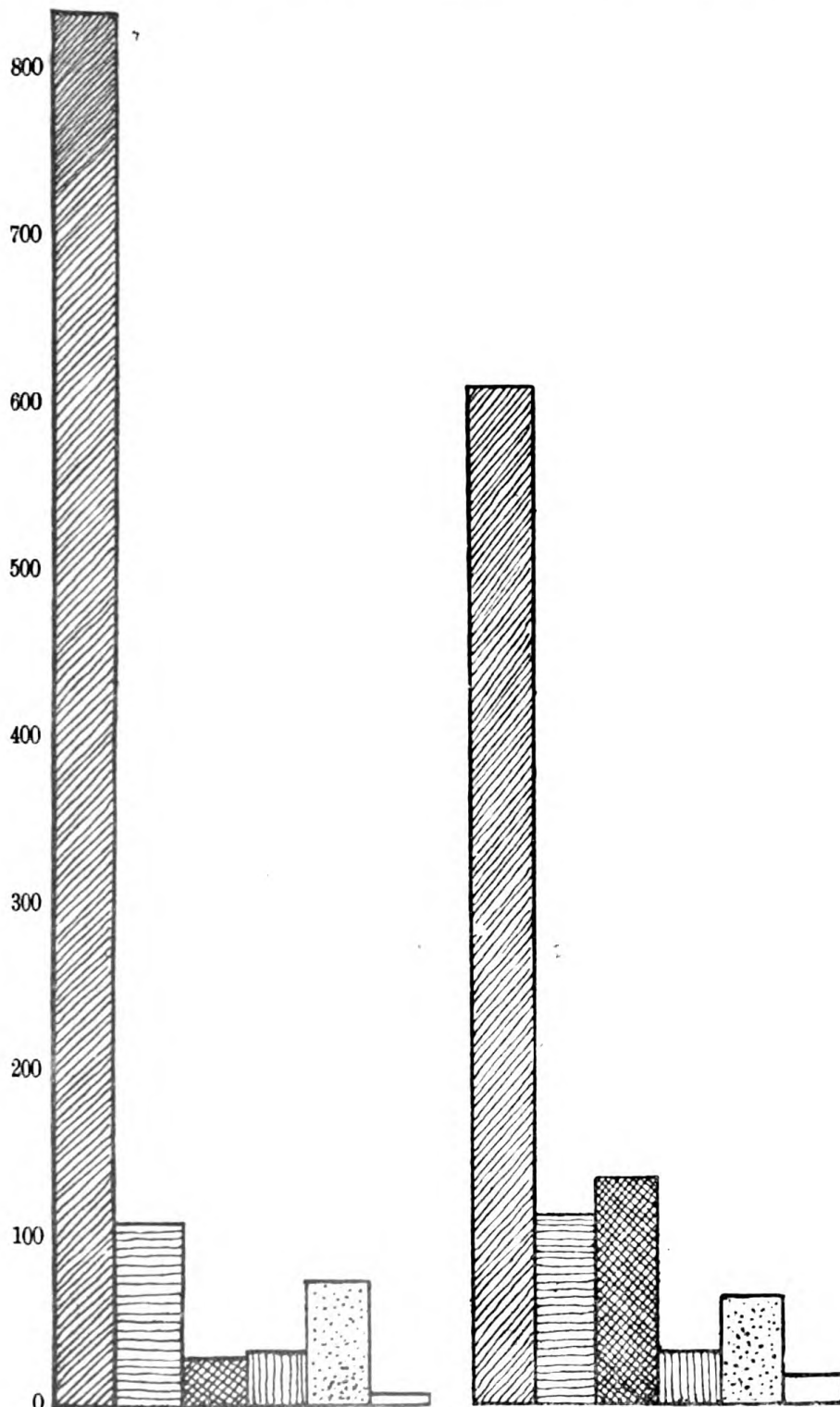


Fig. 2. Das Verhalten der Bakterien in den Organen bei der akuten Form des Milzbrandes.

Bekanntlich erscheinen die Bakterien bei dem Milzbrande in ungeheurer Masse im Blute unmittelbar vor dem Tode des Tieres, und es fragt sich daher, ob diese Bakterienmasse in den Lungen bei der akuten

Form nicht das Resultat des besonderen Blutreichtums dieses Organs sei. Doch zeigten die parallel von mir ausgeführten Untersuchungen

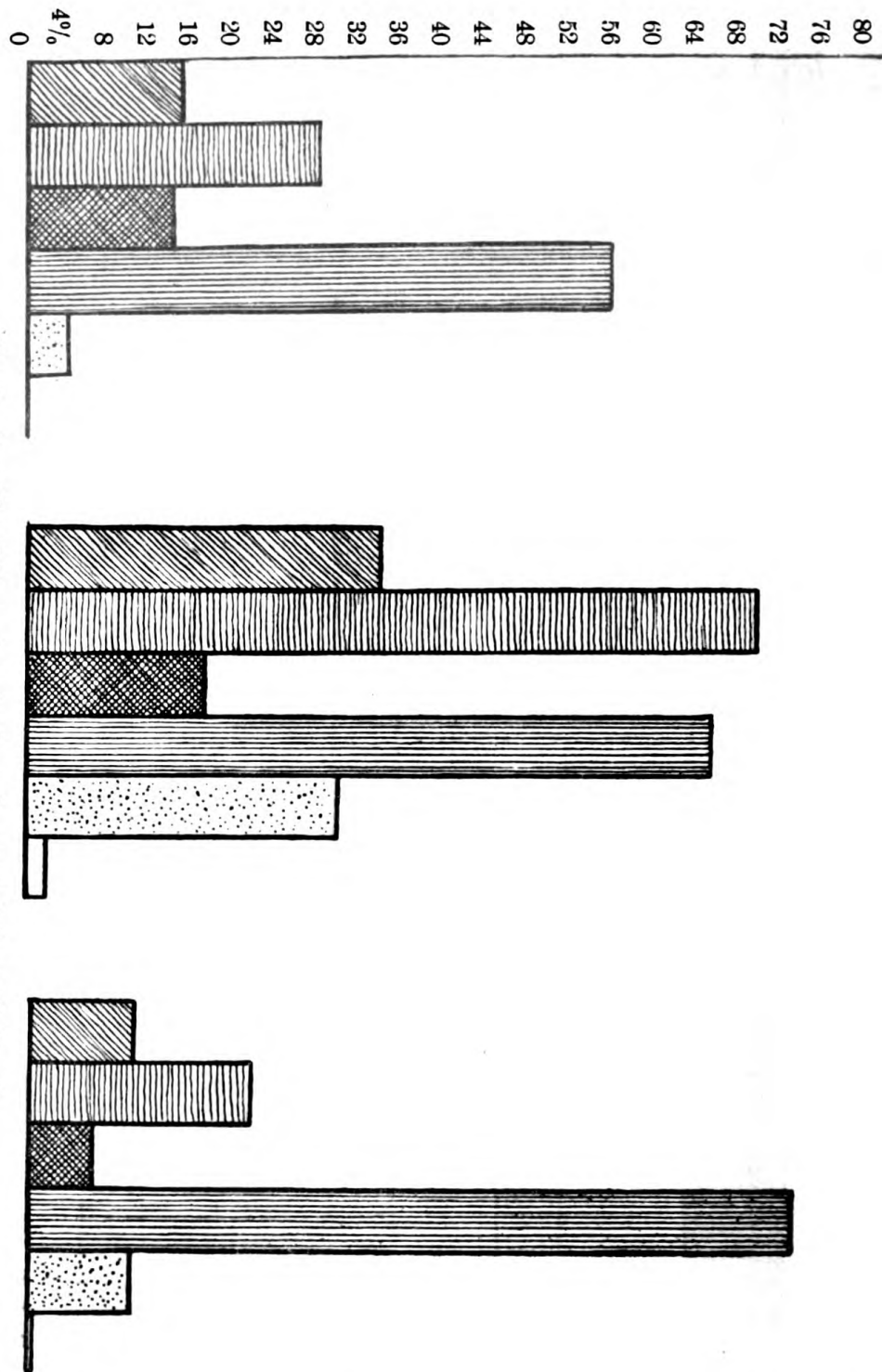


Fig. 3. Der Blutreichtum der einzelnen Organe bei dem Milzbrande.

über den verhältnismäßigen Blutreichtum der einzelnen Organe bei dem akuten Milzbrande, daß die Lungen in dieser Hinsicht bei **weiten** nicht den ersten Platz einnehmen (s. Fig. 3). Auf diese Weise **schein**

die Anwesenheit der ungeheuren Menge von Bakterien in den Lungen beim Milzbrande das Resultat eines besonderen spezifischen Verhältnisses der Lungen zu den Bakterien bei dieser Infektion zu sein. Die Bakterien schaffen ein ernstes Hindernis in dem Blutkreislauf und der Aeration, indem sie die Lungenkapillaren verstopfen — es entsteht die Lungenembolie mit allen ihren Folgen.

Unsere experimentellen Forschungen hinsichtlich der bakteriellen Lungenembolie¹⁾ schaffen die Möglichkeit, zwei charakteristische Perioden in ihrem Gange zu unterscheiden.

Die erste Periode kennzeichnet sich durch Reizerscheinungen der Lungenverästelung des N. vagorum durch Bakterien, welche in die Lungenkapillaren eindringen. Diese Erscheinungen bestehen beim schroffen Fallen des Blutdruckes in der Verzögerung des Pulses und beschleunigter Atmung; dabei werden Veränderungen in der Amplitude der Atmungsschwankungen beobachtet.

In der zweiten Periode der Embolie verschwinden die Reflexerscheinungen und in den Vordergrund treten hauptsächlich die Folgen des mechanischen Hindernisses für die Blutzirkulation im kleinen Blutkreislauf infolge der Verstopfung der Lungenkapillaren durch die Bakterien.

In meinen Versuchen über den experimentellen akuten Milzbrand notierte ich die charakteristischen Erscheinungen der bakteriellen Embolie, soweit dieselben hier ausgeprägt sind.

Zu den Versuchen über den experimentellen Milzbrand übergehend, halten wir es für notwendig, vorher einige Worte über die Ausführung der Versuche selbst zu sagen.

Die Tiere wurden vorher gewogen und die Temperatur in recto festgestellt. Sodann wurden mittels des Kimographen die normalen Kurven des Blutdruckes, des Pulses und der Atmung angeschrieben. Nach dieser Operation ließ man das Tier sich 1—2 Tage erholen. Dann wurde es wieder gewogen, die Temperatur nochmals nachgemessen und sodann

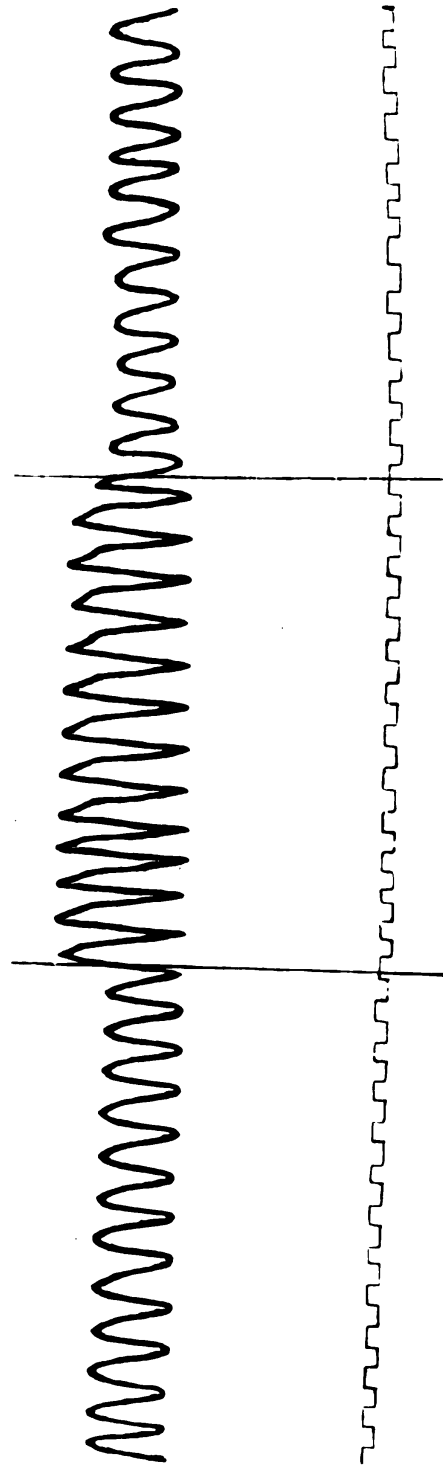


Fig. 4. Versuch No. 1.

1) Siehe Strueff, „Механизмъ смерти при сибирской язвѣ“. [Diss.] Москва 1908.

wurde die Impfung der virulenten Kultur des Milzbrandes unter die Haut ausgeführt.

Beim Eintreten der das Leben bedrohenden Symptome wurden von neuem mit Hilfe des Kimographen die Kurven der Atmung, des Luftdruckes und des Pulses angeschrieben.

Ich will hier als Beispiel 3 Versuche anführen, wo das Anschreiben bis zum Todeseintritt fortgeführt wurde. — Ausführliches siehe in meiner Monographie: „Механизмъ Смерти при Сибирской язвѣ“ („Der Mechanismus des Todes beim Milzbrand“) 1908.

Erster Versuch.

Kaninchenmännchen, Gewicht 1377 g, Temperatur „in recto“ 38,6° wurde am 7. März 10 Uhr abends unter die Haut mit einer Milzbrandkultur in der Dosis von 2 Platinösen geimpft.

Am 8. März hat das Kaninchen ein gesundes Aussehen. Temperatur 38,5°. Am 9. März um 4 Uhr Tagestemperatur 39,5°. Es beginnt der Versuch mit der kymographischen Anschrift der Kurven des Blutdruckes, des Pulses und der Atmung.

Versuch No. 1.

	Normal	Zeit bis zum Tod des Tieres	1 Std. 10 Min.	1 Std. 9 Min.	1 Std. 8 1/2 Min.	1 Std. 8 Min.	50 Min.	48 1/2 Min.	47 Min.	46 Min.	43 Min.	41 Min.	39 Min.
Höhe des Blutdrucks	55		37	34	33	36	35	30	33	30	32 1/2	32	31
Puls	304		208	180	184	192	176	168	176	156	180	176	188
Zahl der Atmung	88		52	60	56	52	56	60	56	64	56	48	44



Fig. 5. Versuch No. 1.

	Normal	Zeit bis zum Tod des Tieres	15 Min.	14 Min.	12 Min.	11 Min.	13 Min.	2 1/2 Min.	2 Min.	1 Min.	0	1 Min. nach völligem At- mungsstill- stand
Höhe des Blut- drucks	55		31	30	32	30	31	32	29	26	9	2
Puls	304		184		184	174	180	182	180	184		
Zahl der Atmung	88		32	32	32	32	24	24	20	20	0	

Während des Versuches notieren sich auf dem kinographischen Bande mehrmals Perioden, bei deren Eintreten Blutdruck und Puls fallen, die Atmung aber rascher wird. Diese Perioden dauern 1–1 1/2 Minuten. Die Amplitude der Atmungsschwan-

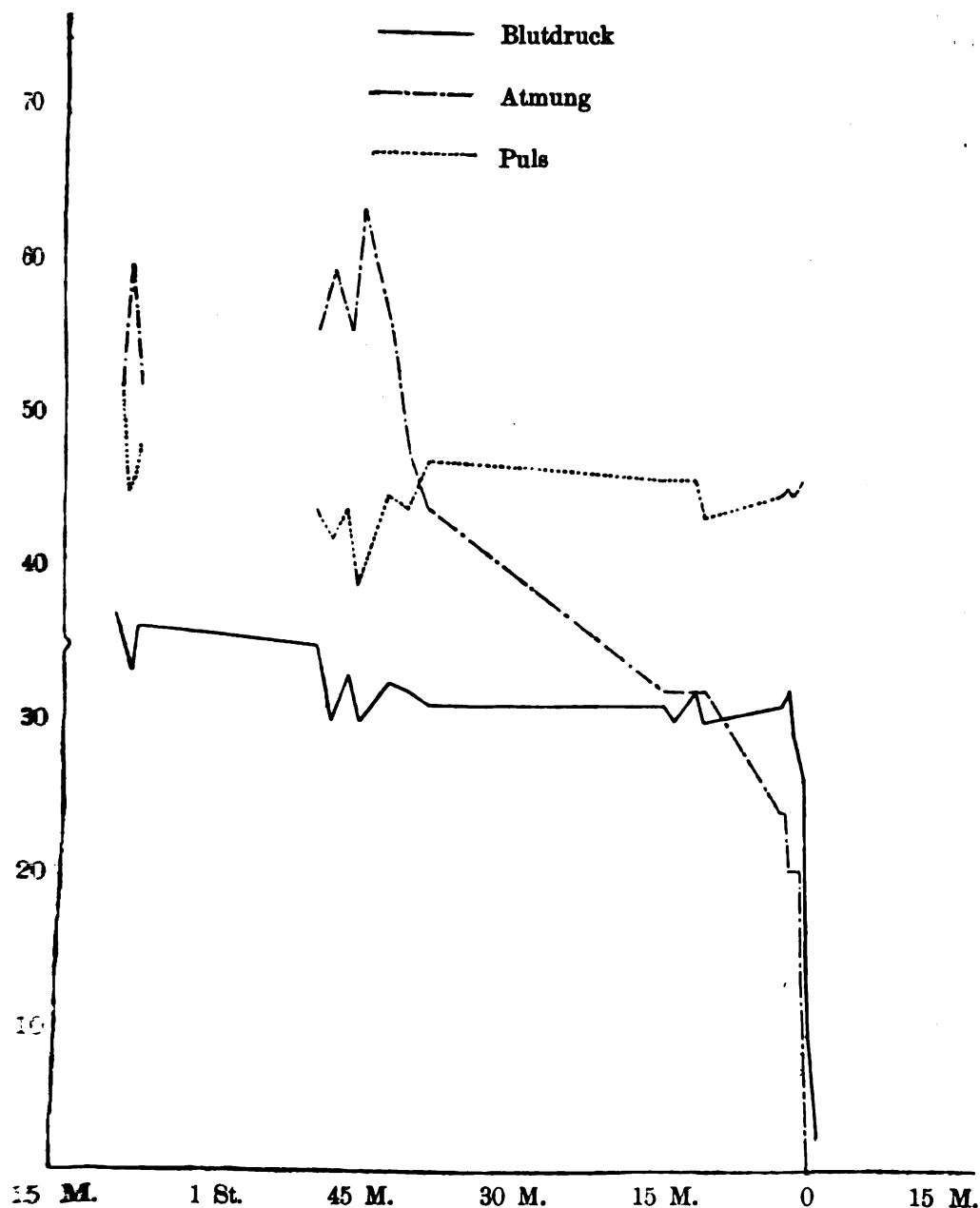


Fig. 6. Versuch No. 1.

wurde die Impfung der virulenten Kultur des Milzbrandes unter die Haut ausgeführt.

Beim Eintreten der das Leben bedrohenden Symptome wurden von neuem mit Hilfe des Kimographen die Kurven der Atmung, des Luftdruckes und des Pulses angeschrieben.

Ich will hier als Beispiel 3 Versuche anführen, wo das Anschreiben bis zum Todeseintritt fortgeführt wurde. — Ausführliches siehe in meiner Monographie: „Механизмъ Смерти при Сибирской язвѣ“ („Der Mechanismus des Todes beim Milzbrand“) 1908.

Erster Versuch.

Kaninchenmännchen, Gewicht 1377 g, Temperatur „in recto“ 38,6° wurde am 7. März 10 Uhr abends unter die Haut mit einer Milzbrandkultur in der Dosis von 2 Platinösen geimpft.

Am 8. März hat das Kaninchen ein gesundes Aussehen. Temperatur 38,5°. Am 9. März um 4 Uhr Tagestemperatur 39,5°. Es beginnt der Versuch mit der kymographischen Anschrift der Kurven des Blutdruckes, des Pulses und der Atmung.

Versuch No. 1.

	Normal	Zeit bis zum Tod des Tieres	1 Std. 10 Min.	1 Std. 9 Min.	1 Std. 8 1/2 Min.	1 Std. 8 Min.	50 Min.	48 1/2 Min.	47 Min.	46 Min.	43 Min.	41 Min.	39 Min.
Höhe des Blutdruckes	55		37	34	33	36	35	30	33	30	32 1/2	32	31
Puls	304		208	180	184	192	176	168	176	156	180	176	188
Zahl der Atmung	88		52	60	56	52	56	60	56	64	56	48	44

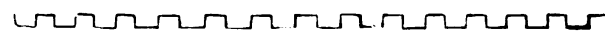
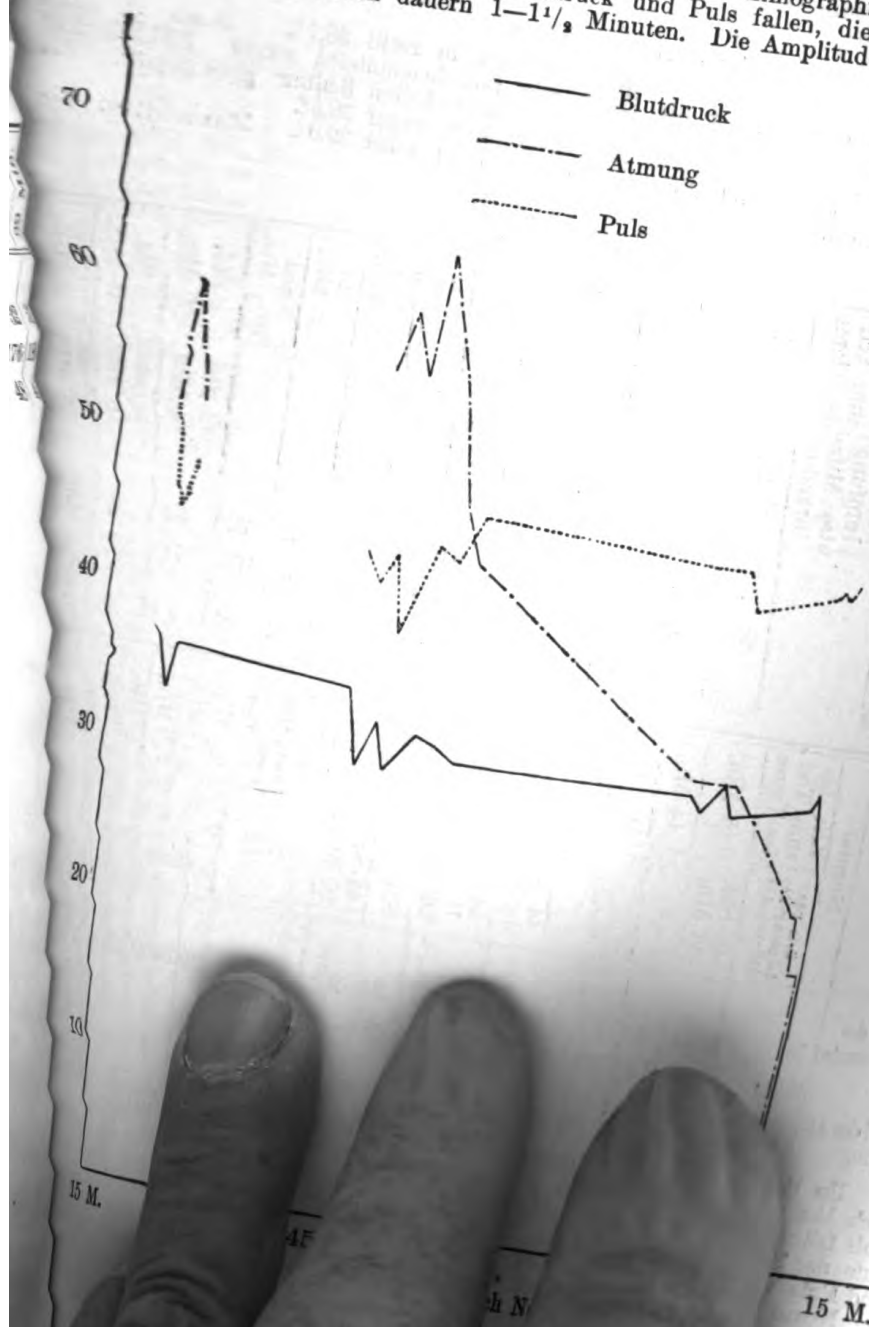


Fig. 5. Versuch No. 1.

	Normal	Zeit bis zum Tod des Tieres	15 Min.	14 Min.	12 Min.	11 Min.	13 Min.	2 1/2 Min.	2 Min.	1 Min.	0	1 Min. nach völligem Atmungsstillstand
Höhe des Blutdrucks	55		31	30	32	30	31	32	29	26	9	2
Puls	304		184		184	174	180	182	180	184		
Zahl der Atmung	88		32	32	32	32	24	24	20	20	0	

Während des Versuches notieren sich auf dem kinographischen Bande mehrmals Perioden, bei deren Eintreten Blutdruck und Puls fallen, die Atmung aber rascher wird. Diese Perioden dauern 1—1 1/2 Minuten. Die Amplitude der Atmungsschwan-



kungen während dieser Perioden wird um $1\frac{1}{2}$ mal größer (Fig. 4). 15 Minuten vor dem Tode wird die Atmung seltener. Die oben beschriebenen Veränderungen sind auf der Kurve des Kimographen nicht wahrzunehmen.

2 Minuten vor dem Tode wird die Atmung noch seltener und nimmt den gewöhnlich nach dem Durchschneiden des *N. vagorum* beobachteten Typus an (Fig. 5).

Der Blutdruck beginnt schnell zu fallen. Endlich um 5 Uhr 10 Minuten treten Krämpfe und der Tod ein.

Autopsie. Die Lungen sind zusammengefallen und blutarm, Leber und Milz voll Blut. Die rechte Herzvorkammer zieht sich noch etwa 40 Minuten energisch zusammen.

Zur besseren Uebersicht übertrugen wir die Resultate des Versuches auf die Tabelle in Form einer graphischen Kurve. Dabei ist die Einheit der Ordinate = 1 mm des Blutdruckes, 2 Atmungen und 4 Pulsschlägen gleich. Auf der Abszisse wird der Zeitraum notiert (Fig. 6).

Zweiter Versuch.

Kaninchenweibchen. Gewicht 2050 g, Temperatur in recto $38,7^{\circ}$. Am 3. März um 6 Uhr 5 Minuten wurde unter die Haut eine Bouillonemulsion von Milzbrandbakterien in der Menge einer in einem Probierglase entwickelten Kultur geimpft. Am 4. Sept. hat das Kaninchen ein gesundes Aussehen. Temperatur $38,5^{\circ}$.

Am 5. Sept. um 10 Uhr 30 Minuten morgens Temperatur $39,0^{\circ}$. Zuweilen legt sich das Kaninchen nieder.

Versuch No. 2.

	Normal	Zeit bis zum Tode des Tieres													
		Zeit vor Impfung des Milzbrandes	41 Std. 25 Min.	2 Std. 55 Min.	2 Std. 53 Min.	2 Std. 50 Min.	2 Std. 38 Min.	2 Std. 32 Min.	2 Std. 25 Min.	2 Std. 24 Min.	2 Std. 22 Min.	2 Std. 20 Min.	2 Std. 18 1/2 Min.	1 Std. 56 Min.	1 Std. 54 Min.
Höhe des Blutdrucks	58		43	44	48	39	39	40	34	34	42	39	44	37	39
Puls	192		208	200	190	180	180	170	160	160	176	164	176	150	
Zahl der Atmung	68		50	50	50	60	50	44	50	50	44	48	44	50	44

	Normal	Zeit bis zum Tode des Tieres													
		Zeit vor Impfung des Milzbrandes	43 Std. 35 Min.	44 Min.	42 1/2 Min.	41 Min.	5 Min.	1 Min. 20 Sek.	30 Sek.	0	Zeit nach völliger Atmungsverdergung — Tod des Tieres				
Höhe des Blutdrucks	58		43	45	50	44	34	40	34	31		29	24	21	13
Puls	192		156	160	156	148			160						
Zahl der Atmung	68		50	50	56	60	36	20	8	0					

Um 11 Uhr begann der Versuch. Wie im vorhergegangenen Versuch, werden auch hier mehrfach Perioden von $1\frac{1}{2}$ Minuten Dauer bemerkt, wo Blutdruck und Puls fallen, die Atmung dagegen plötzlich bedeutend schneller wird, wobei die Amplitude der Schwankungen kürzer ist. Nach Verlauf dieser Perioden steigen Blutdruck und Puls von neuem und die Atmung wird weniger schnell, obgleich erstere doch unter der Norm verbleiben. 5 Minuten vor dem Tode entstehen bemerkbare Pausen zwischen den einzelnen Atemzügen, allmählich werden die Atmungsschwankungen immer klein

und die Atmung bleibt aus. Der Blutdruck sinkt zuerst allmählich, dann fängt er plötzlich rasch zu sinken an. Nach völligem Stillstande der Atmung ist noch während fast 10 Minuten das allmähliche Sinken des Blutdruckes zu beobachten (Fig. 7).

Autopsie. Lungen zusammengefallen, blutarm, das Herz fährt noch fort, sich etwa 18 Minuten lang gut zusammenzuziehen, Leber und Milz sind blutreich und vergrößert (Fig. 8).

Bezeichnungen bleiben dieselben.

Dritter Versuch.

Kaninchenmännchen. Gewicht 2190 g, Temperatur in recto 38,6°. Am 21. Aug. um 11^{1/4} Uhr vormittags wurde eine Impfung von Bouillonemulsion des Milzbrandes unter die Haut gemacht, in der Dosis, die sich in einem Probierglase entwickelte.

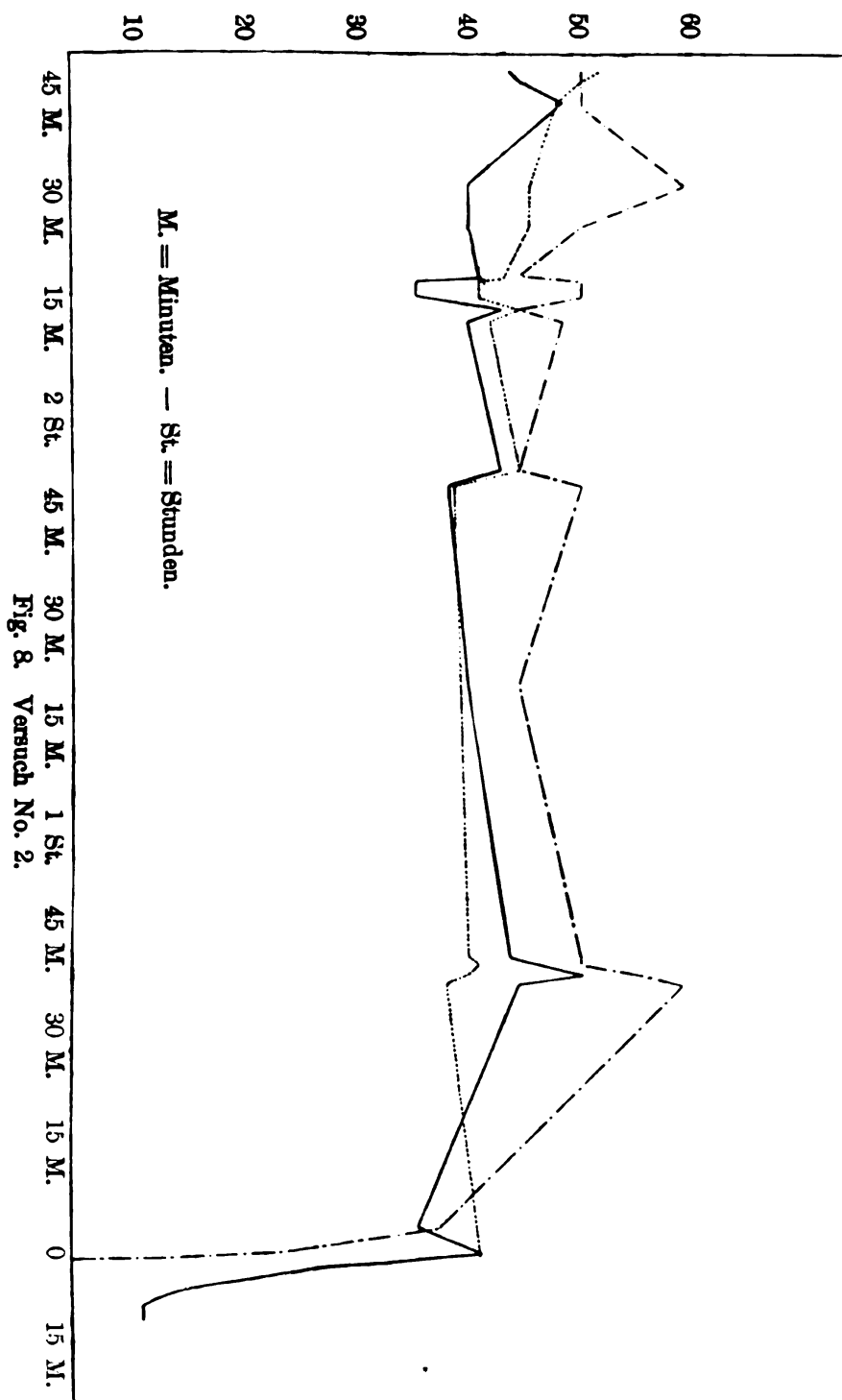
Versuch No. 3.

	Zeit vor Impfung des Milz- brandes zum Tod des Tiere	1 Std.	4 Min.	1 Std.	3 ^{1/2} Min.	1 Std.	2 ^{1/2} Min.	1 Std.	1 Min.	1 Std.	30 Min.	7 Min.	1 Min.	48 Std.	30 Sek.	0	Zeit nach Atmungs- stillstand	30 Sek.	1 ^{1/2} Min.
Höhe des Blut- drucks		50																15	14
Puls		216	19	150	160	23	18	18	18	17	18	18	18		15	16		170	170
Zahl der Atmung		48	60	50	50	60	56	50	40	40	40	168	170	32	30	0			

Fig. 7. Versuch No. 2. Tod des Tieres. 2mal verkleinert.

Am 22. Aug. hat das Kaninchen ein gesundes Aussehen.

Am 23. Aug. um 11 Uhr vormittags ist es schwach. Die Temperatur, welche nach dem Anbinden an den Halter gemessen wurde, zeigte keine Erhöhung. Eine



Stunde 4 Minuten vor dem Tode deutete die kymographische Kurve auf die für die erste Periode der Embolie charakteristischen Erscheinungen, nämlich auf das Fallen des Blutdruckes, des Pulses und auf die Beschleunigung der Atmung, welche etwa eine Minute andauern. Darauf steigen Blutdruck und Puls von neuem, erreichen aber nicht die Norm, die Atmung dagegen wird seltener.

Nach Verlauf der eben geschilderten Periode wird die Atmung bis zum völligen Stillstand allmählich immer seltener, der Blutdruck bleibt fast bis zum Schlusse des Versuches auf derselben Höhe, nur langsam sinkend und auf einer gewissen Höhe sogar nach völligem Atmungsstillstand beharrend.

Autopsie. Lungen blutarm, stellenweise Blutergüsse. Die Herzvorkammern ziehen sich fast 43 Minuten gut zusammen. Das rechte Herz ist erweitert, Leber und Milz blutreich (Fig. 9).

Die Analyse der eben angeführten Versuche gibt die Möglichkeit, wahrzunehmen, daß in der Dauer des akuten experimentellen Milzbrandes vollständig klar die Veränderungen zu beobachten sind, welche der ersten Periode der Lungenembolie entsprechen, wo hauptsächlich die Erscheinungen der Reflexion seitens der Lungenverästelung des Vagorum hervortreten. Diese Veränderungen werden durch entsprechende periodische Senkungen des Blutdruckes, durch Verzögerung des Pulses und Beschleunigung der Atmung ausgedrückt, worauf wir bei Beschreibung der Versuche hinwiesen. Die Wiederholung der für die erste Periode der Embolie charakteristischen Erscheinungen beim Milzbrande kann als Hinweis darauf dienen, daß die Bakterien bei dieser Infektion nicht auf einmal, sondern portionsweise ins Blut geraten, wobei sie, jedem Eindringen in die Lungengefäße entsprechend, wiederholte Reizungen der Verästelung des Vagorum bewirken. Wenn die Bakterien auch fortwährend ins Blut eindringen sollten, so geschieht das nämlich zu gewissen Zeiträumen in größerer Menge.

Unmittelbar nach den für die erste Periode der Lungenembolie bei dem akuten Milzbrande charakteristischen Veränderungen beobachtete ich noch andere, welche der zweiten Periode der Embolie entsprechen.

Auf die gleiche Weise, wie bei der Lungenembolie, verlaufen während dieser Periode des Milzbrandes Blutdruck, Puls und Atmung einigermaßen gleichmäßig, ohne schroffe Schwankungen, wobei der Druck allmählich nachläßt und die Atmung seltener wird. Wie ich schon in



Fig. 9. Versuch No. 3. Ende des Versuches.

meiner oben genannten Arbeit nachgewiesen habe, ist die zweite Periode der bakteriellen Lungenembolie das Ergebnis eines mechanischen Hindernisses im kleinen Blutkreislaufe infolge von Ueberfüllung der Lungenkapillare mit Bakterien. Dieselbe Ursache aber ist, wie wir oben aus den Tabellen mit den Bakterienzahlen in den einzelnen Organen ersehen, auch beim akuten Milzbrande der Fall.

Was den Herzzustand bei dem akuten Milzbrande anbetrifft, so haben die speziellen, von uns nach dem Schema von Romberg ausgeführten Versuche gezeigt, daß das Herz vollständig seine Arbeitsfähigkeit bis zum vollen Atmungsstillstande bewahrt, was auch aus der unten angeführten Tabelle ersichtlich ist (siehe Tabelle).

Tabelle.

	Beim gesunden Kaninchen		Beim kranken Tier					
	Versuch No. 6	Versuch No. 2	Zeit vor dem Tode des Tieres	10 Std. No. 6	2 Std. 40 Min. No. 2	1 Std. 53 Min. No. 2	43 1/2 Min. No. 2	3 Min. n. voll. Stillstand d. Atmung No. 2
Elektrisation der Nasenschleimhaut	43 Proz.	36 Proz.	Das absolute Steigen des Blutdrucks	33 Proz.	68 Proz.	69 Proz.	62 Proz.	25 Proz.
			Das relative Steigen des Blutdrucks	40 Proz.	36 Proz.	25 Proz.	20 Proz.	
Massage des Bauches	15 Proz.	15 Proz.	Das absolute Steigen des Blutdrucks	16 Proz.	28 Proz.			
			Das relative Steigen des Blutdrucks	21 Proz.	7 Proz.			
Asfiktion	32 Proz.	15 Proz.	Das absolute Steigen des Blutdrucks	13 Proz.	20 Proz.			
			Das relative Steigen des Blutdrucks		18 Proz.			

Bei der Autopsie der dem akuten experimentellen Milzbrande erlegenen Tiere wurde in den meisten Versuchsfällen während einer ziemlich geraumen Zeit (bis 55 Minuten) ein energisches Zusammenziehen des Herzens beobachtet. Diese Tatsache haben wir auch bei der Lungenembolie wahrgenommen, ebenso wie Wolf¹⁾.

Auf Grund aller angeführten Erfahrungen sind wir berechtigt, folgende Schlüsse zu ziehen:

Der Tod am akuten Milzbrande ist eine Folge der bakteriellen Embolie der Lungen zur Zeit, wo die übrigen Veränderungen in den Organen noch nicht so weit vorgedrungen sind, daß sie das Leben bedrohen könnten. Daraus folgt, daß, wenn auch Toxine beim Milzbrande zugegen sind, die im Laufe des akuten Milzbrandes gebildete Menge derselben nicht so groß ist, um bemerkbar zu sein.

Eher sind die Toxine in Fällen des verzögerten Milzbrandes zu suchen.

1) Wolf, Experimentelle Studien über Luftembolie. (Virch. Arch. Bd. CLXXIV. 1903.)

Nachdruck verboten.

Zur Aetiologie der Cystitis im Säuglingsalter (*Bacillus bifidus communis* und ein *Paracolibacillus*).

[Aus der k. k. Universitäts-Kinderklinik in Wien (Vorstand: Hofrat Escherich).]

Von Dr. E. Rach und Dr. A. v. Reuss.

Mit 2 Figuren.

Im März 1908 kam an der hiesigen pädiatrischen Klinik ein 2 Monate alter Knabe mit Ikterus und Cystitis zur Beobachtung, bei dem sich aus dem Harn und nach dem Tode auch aus den inneren Organen ein dem *Bacterium coli commune* verwandtes Stäbchen und der *Bacillus bifidus communis* (Tissier) isolieren ließen. Da wir in der Literatur nur eine einzige Angabe über das pathogene Verhalten dieses im Säuglingsdarm ungemein häufig vorkommenden Anaërobions finden konnten, erscheint uns der genannte Fall auch aus diesem Grunde bemerkenswert.

Max K., geb. am 29. Dez. 1907. Eltern gesund. 6., leichte normale Geburt. Ikterus neonat. durch 4 Tage. Ernährung von Anfang an künstlich ($\frac{1}{2}$ -Milch). Körpergewichtszunahme. Keine Verdauungsstörungen.

Am 28. Febr. 1908 zeigte das damals fast 9 Wochen alte Kind üble Laune und verweigerte die Nahrungsaufnahme. Tags darauf hatte sich das Allgemeinbefinden sichtlich verschlechtert. Das Kind sah verfallen aus, und die Haut zeigte eine gelbe Verfärbung. Stuhl an diesem Tage angeblich „schön“, kein Erbrechen. An den folgenden Tagen blieb die gelbe Hautfarbe unverändert bestehen; die Stühle waren weißlich, doch blieben sie geformt und ihre Zahl war nicht vermehrt. Es sei bemerkt, daß in der Umgebung des Kindes keine Fälle von Darmkatarrh oder Gelbsucht vorkamen, und ausdrücklich hervorgehoben, daß das Kind niemals katheterisiert worden war.

Am 7. März 1908 wurde das Kind unter Prot. No. 405 auf die k. k. pädiatrische Klinik aufgenommen. Damals bot es folgenden Befund:

60 cm lang, 4320 g schwer, gracil, mäßig gut genährt. Sensorium frei, Geschrei und Bewegungen lebhaft, fast die ganze Nacht ruhiger Schlaf. Haut des ganzen Körpers intensiv gelb, Turgor herabgesetzt. Große Fontanelle beträchtlich eingesunken, Schädelknochen übereinandergeschoben. Temp. 37,9. Skleren und sichtbare Schleimhäute deutlich ikterisch. Lungen und Herz o. B. Puls etwas verlangsamt (90). Bauch leicht aufgetrieben, anscheinend nirgends druckempfindlich, Bauchdecken straff. Der ziemlich scharfe Leberrand in der Mamillarlinie 2 Querfinger unter dem Rippenbogen tastbar: die Konsistenz der Leber eher schlaff, ihre Oberfläche glatt; Gallenblase nicht abgrenzbar. Milz nicht mit Sicherheit tastbar. Nahrungsaufnahme gering (Buttermilch). Seit 24 Stunden 2mal Erbrechen. 2mal ausgiebige Stuhlentleerung.

Stuhl geformt, teigig, homogen, hell, ockerfarbig, stark faulig riechend, sehr fettreich. Im mikroskopischen Präparat reichlich Fetttropfen und Schollen (Seifen), keine Nadeln. Reaktion alkalisch. Ehrliche Dimethylamidobenzaldehydreaktion stark positiv. Hydrobilirubin in ziemlich reichlicher Menge (Rotfärbung bei Schmidt-scher Sublimatprobe, Schlesingers Zinkacetatprobe positiv), in geringen Mengen auch unverändertes Bilirubin (Huppertsche Probe).

Der (frisch gelassene) Harn zeigt eine intensive gleichmäßige Trübung und überdies einzelne feine Flocken. Nach kurzem Stehen setzt sich reichliches gelblich-weißes Sediment ab, die darüberstehende Flüssigkeit bleibt nur wenig getrübt.

Farbe des Harns bräunlich-gelb, Reaktion sauer. Eiweiß in Spuren (auf Essigsäurezusatz ganz geringe, auf Zusatz von Ferrocyankalium deutliche, wolkige Trübung), mit den gewöhnlichen Methoden quantitativ nicht bestimmbar. Gallenfarbstoff (Bilirubin) deutlich nachweisbar, weder Urobilin noch Urobilinogen. Kein Blutfarbstoff. Kein Zucker. Kein Aceton. Indikan in beträchtlicher Menge.

Im Sediment überaus reichlich zellige Elemente, und zwar teils polynukleäre Leukocyten, teils einkernige, rundliche oder polygonale Zellen — einzeln oder in epithelialen Verbänden von unregelmäßiger Gestalt und verschiedener Größe (abgestoßenes Epithel der Harnwege); keine Zylinder. Außer diesen zelligen Elementen reichlich Mikroorganismen, meist frei, einzeln oder in mehr oder weniger dichten Haufen, sehr häufig

in den schmalen Spalträumen zwischen den in epithelialer Anordnung befindlichen Zellen, nur zum geringen Teil intracellulär. Bei Färbung nach Gram und Nachfärbung mit wässriger Fuchsinlösung lassen sich unter diesen Mikroorganismen zwei Arten von Stäbchen unterscheiden, deren Zahlenverhältnis zueinander bei der wiederholt vorgenommenen Untersuchung verschieden war.

Die Stäbchen der einen Art waren gramnegativ, 1,8—3,6 μ lang und 0,6 μ breit; nur vereinzelt fanden sich 3—4mal so lange Fäden. Sie zeigten abgerundete Enden, mitunter deutliche Polfärbung.

Die Stäbchen der zweiten Art waren grampositiv, bis 4 μ lang, schmaler, gerade oder leicht gekrümmt und überdies durch großen Formenreichtum, sowie durch Verzweigungen gekennzeichnet. Mitunter fanden sie sich in großer Zahl dicht beieinander in annähernd radiärer Anordnung mit innig sich verflechtenden Verzweigungen. Häufiger lagen sie zu zweit hintereinander, nur durch einen schmalen Spalt voneinander getrennt (als „Diplobacillen“) oder auch in Form mehrgliedriger Fäden. Die Gramsche Färbung

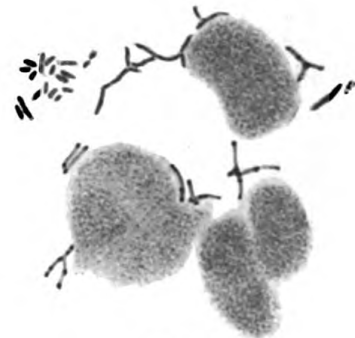


Fig. 2.

Fig. 1. Harnsediment, Färbung nach Gram. (Vergr. 1:1200.)

Fig. 2. Harnsediment, Färbung mit Methyleneblau. (Vergr. 1:1200.)

Fig. 1.

nahmen diese Stäbchen nicht ganz gleichmäßig an, sondern sie erschienen segmentiert gefärbt oder gekörnt. Sie zeigten häufig Anschwellungen, entweder in der Mitte, wodurch sie tonnenförmige Gestalt erhielten, oder an den Polen, wodurch keulenartige oder kolbige Formen entstanden. Waren Stäbchen paarweise angeordnet, so waren derartige Kolben entweder an den einander zugewendeten oder an den abgewendeten oder an beiden Enden sichtbar. Ungemein häufig fanden sich Verzweigungen, in dem die Stäbchen sich an einem Ende unter annähernd rechtem Winkel in zwei Arme teilten, die oft sehr kurz, oft jedoch auch länger waren und an die sich — auch ihrerseits wieder weiterverzweigte Stäbchen angliedern konnten (Fig. 1).

Bei Färbung mit wässriger alkalischer Methyleneblaulösung ließen sich in den Stäbchen reichlich rundliche — metachromatische — violettrote Körnchen verschiedener Größe nachweisen, die durch einen ungefärbten Hof scharf von dem übrigen Bakterienleib getrennt waren; sie fanden sich meistens an den Polen, am häufigsten in den Anschwellungen, von denen die Verzweigungen entsprangen. (Fig. 2.)

Zur kulturellen Untersuchung bestrichen wir zunächst die Oberfläche gewöhnlicher Agarplatten mit dem Sediment steril aufgefangenen Harnes. Jedesmal erhielten wir eine Reinkultur des gramnegativen Stäbchens.

Das grampositive Stäbchen erhielten wir bei genügender Verdünnung des Ausgangsmaterials ohne Schwierigkeit in hochgeschichtetem Traubenzuckeragar nach der Veillon'schen Methode der Anaërobenzüchtung. Ueber die näheren kulturellen Eigenschaften beider Arten soll weiter unten ausführlich berichtet werden.

Vom weiteren Verlauf der Krankheit sei noch folgendes hervorgehoben:

12. März. Ikterus fast verschwunden. Hautfarbe sehr anämisch. Stühle 1—2mal täglich, trotz fettarmer Nahrung (Buttermilch) noch immer sehr fettreich, massig. Im Harn nur mehr Spuren von Gallenfarbstoff; Eiweißgehalt und Sediment unverändert; Nahrungsaufnahme besser, hie und da Erbrechen. Gew. 4250 g. Kein Fieber.

17. März. Ziemlich unvermuteter Temperaturanstieg, bis 39,8, ohne wesentliche Änderung des Befundes. Die Milz läßt sich 1½, Querfinger unter dem Rippenbogen deutlich palpieren.

Therapie: Urotropin 0,5 g täglich.

20. März. Noch immer etwas Fieber mit Intermissionen, 37,8—38,2. Ikterus jetzt sicher vollkommen verschwunden.

25. März. Nach 2-tägiger Pause abermals Fieber, 38,0—38,4. L. h. o. bronchopneumonischer Herd. Husten. Gew. 4350 g.

24-stündige Harnmenge 270 ccm. Spez. Gew. 1,018. Harnbefund unverändert.

30. März. Nach fieberfreien Tagen rasch vorübergehende Temperatursteigerungen auf 38,0, 39,2, 38,4. Infiltrationsercheinungen und Harnbefund unverändert. Gewichtsabnahme (4150 g). Aussehen wesentlich schlechter.

Das Blutserum agglutiniert den aus dem Harn gezüchteten *Paracolonbacillus* in Verdünnungen bis 1:400 im Verlauf einer halben Stunde bei Zimmertemperatur.

4. April. Gewicht auf 3890 g gesunken. Haut anämisch, fahl, schlaff. Deutliche Abmagerung. Kein Ikterus. Große Fontanelle eingesunken. Sensorium frei. Augen klar. Duldermiene. Stimme kraftlos. L. h. vom Ang. scap. abwärts Schallverkürzung, weiches Bronchialatmen, Bronchophonie, spärliche Rasselgeräusche. Häufig heftiger, anfallsweise auftretender Reizhusten.

Im Harn seit 3. April reichlich Eiweiß, ca. 1,5 Prom. (Brandberg). Im Sediment außer den unverändert reichlichen zelligen Bestandteilen zum ersten Male granulierten Zylinder.

Ernährung: Liebig-Suppe. Nahrungsaufnahme schlecht. Stühle pastenartig, dunkelbraun, 1—2 täglich. Temperatur bald afebril, bald rasch vorübergehendes Fieber.

Therapie: Urotropin, Infusum Ipecac., Digalen.

6. April. Eiweiß ½ Prom. Reichlich granulierten Zylinder.

7. April. Nach Temperaturanstieg auf 39,6 Kollaps (35,0). Rapide Gewichtsabnahme. Eiweiß über ½ Prom. Sehr viel Zylinder.

10. April. Rasch fortschreitender Verfall. Sopor. Abends Exitus let.

Sektionsbefund vom 11. April 1908 (Prof. A. Ghon).

56 cm lange, männliche Kindesleiche, gracil, mit dürrtigem Panniculus, rhachitisch. Haut und Schleimhaut blaß. Vordere Fontanelle offen (6,5:5,5). Dura fixiert. Innere Hirnhäute stark durchfeuchtet, zart. Gehirnschubstanz gleichfalls feucht, blaß. Pleura, Pericard und Peritoneum stark klebrig. Lungen lufthaltig, ihre vorderen Randpartien gebläht, anämisch. Die hinteren Partien beider Unterlappen weniger lufthaltig, zum Teil luftleer und von kleinen, teilweise konfluierenden, grauroten, pneumonischen Herden durchsetzt. In den Bronchien, vorwiegend der Unterlappen, dickes, eiteriges Sekret, die Schleimhaut gerötet. Herz entsprechend groß, schlaff. Pulmonalis, Aorta und periphere Gefäße zart. Im Magen in mäßiger Menge schleimiger, weißlich-grauer, von kaffeesatzfarbenen Streifen durchzogener Inhalt. Seine Schleimhaut blaß und dünn. Im Dünndarm in mäßiger Menge gelblich-braune, dünnbreiige Chymusmassen, Schleimhaut durchweg dünn, im untersten Ileum schwarzgrau pigmentierte Plaques und einige leicht gerötete und leicht geschwollene Follikel. Gegen das obere Ileum zu sind die Plaques stellenweise nur an den leicht geröteten Randpartien erkennbar. Schleimhaut des Jejunum und Duodenum schwach gallig imbibiert. Im Dickdarm in ziemlich reichlicher Menge gelblich-brauner, dünnbreiiger Inhalt, der im Coecum zum Teil gasaltig und stinkend ist, im Colon desc. reichliche Schleimbeimengung zeigt. Der Dickdarm aufgetrieben, seine Wand dünn, die Schleimhaut blaßgrau. Die dichtstehenden zahlreichen Follikel mohn- bis hirsekorn groß, flach-erhaben, durchweg grau pigmentiert, und zwar teils gleichmäßig, teils mit zentralem grauen Punkt und periph. grauen Hof. Leber 150 g schwer, glatt, scharfrandig und zäh. Ihre Schnittfläche gelblich-braun, ihre Zeichnung undeutlich; an einzelnen Stellen kleinste ockergelbe Fleckchen sichtbar. In der Gallenblase ziemlich reichlich zähe, gelbbraune Galle. Milz mit dem Zwerchfell leicht verklebt, 30 g schwer, ihre Kapsel zum Teil milchig getrübt, ihre Pulpa dunkelbraunrot und in geringem Maße abstreifbar, ihre Follikel nicht erkennbar. Lymphdrüsen am Hals, in den Achselhöhlen und in inguine etwa hanfkorngroß, blaß.

Thorakale Lymphdrüsen klein, an der Bifurkation bis kleinbohnen groß. Lymphdrüsen des Mesocolon höchstens bis kleinlinsengroß, am Ansatz des Colon stark gerötet, gegen die Radix zu grau. Mesenteriale Lymphdrüsen bis erbsengroß, graugelblich, die der Ileocöcalklappe regionären fast gleichmäßig grau. Tonsillen hanfkorngroß. Pharynx-tonsille flach, klein, Thymus ganz atrophisch, von Fett substituiert.

Die Nieren je 25 g schwer, embryonal gelappt, ihre Kapsel an den unteren Polen grau pigmentiert, schwer abziehbar. Oberfläche flach höckerig, die vorspringenden Teile weißlich-grau, die eingesunkenen rötlich- oder gelblich-grau. Auf der Schnittfläche die Rinde stark verschmälert, von der Marksubstanz schwer differenzierbar: in beiden Anteilen unscharfe, gelblich-graue Flecken sichtbar. Die Schleimhaut der Kelche und Becken blaß. In der Harnblase Spuren leicht trüben Harnes, Schleimhaut im allgemeinen blaß, nur an der hinteren Wand in begrenztem Umkreis rosafarben, etwas geschwollen, mit einigen punktförmigen kleinsten Blutungen. Aus dem Colliculus seminalis quillt auf leichten Druck in ziemlicher Menge eine weiße schleimige Flüssigkeit hervor. Ähnliche Massen im linken Samenbläschen. Prostata klein, derb, ohne besondere Veränderungen.

Anatomische Diagnose.

Rekrudeszierender Katarrh des Dickdarms und des untersten Ileums; chronischer Magenkatarrh mit Atrophie der Schleimhaut; eiterige Bronchitis; Lobulärpneumonien in den hinteren Partien beider Unterlappen; Pyelonephritis mit Atrophie der Nieren, Cystitis; Atrophie der Leber; chronischer Milztumor; Degeneration des Herzmuskels; Rachitis.

Zur histologischen Untersuchung gelangte außer Leber, Milz und verschiedenen Stücken aus Dünn- und Dickdarm, deren Befund als nicht belangreich hier übergangen werden kann, die rechte Niere und die Blase im Zusammenhang mit der Prostata.

Auf Schnitten durch die Niere, die von der Oberfläche bis zum Hilus reichen, erkennt man bei Färbung mit Hämalaun-Eosin im Bereich des spaltförmig erscheinenden Nierenbeckens eiteriges, stellenweise aus nekrotischen Zellen und Schollen bestehendes Exsudat in dünner Schicht.

Mit ähnlichen oder mehr krümeligen, feinkörnigen oder auch homogenen Exsudatmassen sind in der Marksubstanz zahlreiche, in der Rinde vereinzelte, ziemlich gleichmäßig erweiterte Harnkanälchen ausgefüllt.

In der letzteren enthalten auch einzelne Glomeruli in ihrem Kapselraum reichlich feinkörniges Exsudat mit spärlichen Eiterzellen. In der Rinde finden sich ferner verschieden große Anhäufungen von mehrkernigen Leukocyten, die das verbreiterte und gewucherte interstitielle Gewebe durchsetzen, und Leukocyten auf der Durchwanderung durch das Epithel der Harnkanälchen. Reichlich finden sich in den Spalträumen des interstitiellen Bindegewebes Häufchen von Gallenpigment (Ikterus).

Zusammenfassend können wir demnach sagen, daß die pathologischen Veränderungen in ihrer Schwere von der Marksubstanz gegen die Rinde zu abnehmen und daß die histologische Untersuchung den typischen Befund einer Pyelonephritis ergibt. Bei Färbung auf Bakterien nach Gram-Weigert oder deutlicher bei Färbung mit polychromem Methylenblau lassen sich in diesen Schnitten im Exsudat des Nierenbeckens plumpe, blaß gefärbte Stäbchen, mitunter mit deutlicher Polfärbung, und schlanke, weitaus intensiver gefärbte Stäbchen mit gekörntem Leib, mit Anschwellungen, hie und da auch mit Verzweigungen nachweisen und voneinander deutlich unterscheiden.

Die Untersuchung der Harnblase ergab außer Schwellung der Schleimhaut und einer Desquamation des Epithels an einzelnen Stellen zerstreute kleine Hämorrhagien und Anhäufungen von vorwiegend einkernigen, teilweise auch mehrkernigen Leukocyten im Epithel und in der subepithelialen Schicht.

Auf Schnitten durch die Harnblase und die angrenzende Prostata im Niveau des Colliculus seminalis, auf denen der Utriculus prostaticus in seiner ganzen Länge getroffen ist, sieht man diesen erweitert und ganz erfüllt von abgeschilferten platten Zellen und ungemein zahlreichen dichten Bakterienhaufen, unter denen bei geeigneter Färbung wieder beide Arten von Stäbchen sich unterscheiden ließen. Die gleichen Elemente hatten übrigens auch die Ausstrichpräparate des bei der Sektion aus dem Colliculus seminalis ausgedrückten Sekretes gezeigt.

Dieser Befund erscheint uns als histologisches Detail erwähnenswert, weil demnach der Utriculus prostaticus bei Cystitis als Brutstätte der dort vor dem Wegschwemmen geschützten Bakterien in Betracht zu kommen scheint. Entzündliche Veränderungen waren in der Prostata nicht nachweisbar.

Zur bakteriologischen Untersuchung gelangte von der Leiche: Herzblut, Galle, Saft von der Milz, Eiter aus dem Nierenbecken, der Inhalt der Blase und des

Colliculus seminalis, sowie der Inhalt mehrerer Abschnitte des Dünn- und Dickdarms. Alles wurde zunächst mikroskopisch und dann kulturell aërob (auf Lackmusnutrose-milchzuckeragar nach v. Drigalski-Conradi, aber ohne Zusatz von Kristallviolett) und anaërob (in hochgeschichtetem Traubenzuckeragar) untersucht. Die Kulturen vom Herzblut und von der Galle blieben steril; in der Milz fand sich in Reinkultur ein gramnegatives Stäbchen, das Lackmusmilchzuckeragar blau ließ, Traubenzuckeragar zerprengte. Im Inhalt der Blase, des Nierenbeckens und des Colliculus seminalis ließ sich mikroskopisch und kulturell ein Gemenge eines aëroben gramnegativen Stäbchens, das Lackmusmilchzuckeragar blau ließ, und eines anaëroben, grampositiven, verzweigten Stäbchens nachweisen. Aus dem Dünn- und Dickdarminhalt der Leiche konnten ebenso wenig wie — um dies gleich hier zu erwähnen — bei der mehrmals intra vitam vorgenommenen Stuhluntersuchung trotz viel darauf verwendeter Sorgfalt Mikroorganismen, die einer dieser beiden Arten entsprochen hätten, isoliert werden. Insbesondere gelang es auch bei der mikroskopischen Durchmusterung von Ausstrichpräparaten aus dem Darminhalt nicht, verzweigte Bacillen aufzufinden, die mit Sicherheit dem *Bacillus bifidus communis* entsprochen hätten.

Die aus der Milz, dem Nierenbecken und der Blase gezüchteten aëroben Stämme erwiesen sich bei näherer Prüfung als untereinander und mit dem aus dem Harn intra vitam gezüchteten Stamm identisch. In seinem mikroskopischen Aussehen und in seinem Wachstum auf Agar, Kartoffel und Bouillon unterschied sich das Stäbchen nicht vom typischen *Bacterium coli commune*.

Auf Gelatine, die nicht verflüssigt wurde, entstanden weinblattartige Oberflächenkolonien. Sporenbildung fehlte; Eigenbewegung war — bei wiederholten Beobachtungen — nie nachweisbar. In Traubenzucker wurde Gas gebildet; in Peptonwasser war schon am 4. Tage reichlich Indol nachweisbar. In Petruschkys Lackmusmolke, die schon nach 24 Stunden rot und getrübt war, bildete sich nach 48 Stunden reichlicher Bodensatz. Rothberger-Schäfferscher Neutralrotagar wurde zur Fluoreszenz und Entfärbung gebracht; Kolonien auf Endoschem Fuchsinagar waren rot; auf Löfflerschem Malachitgrünagar erfolgte üppiges Wachstum. Auf Nutroseagarplatten mit Zusatz von 15 Proz. Lackmustinktur (Kahlbaum) und 1,5 Proz. Milchzucker erfolgte niemals Rötung, auch nicht in den Versuchen mit den späteren Generationen nach fast 1 Jahr langer Fortzuchtung).

Diesem Verhalten entsprach auch — im Gegensatz zu *Bacterium coli commune* — die spät eintretende Säurebildung auf Molke und Milch; die Gerinnung der Milch erfolgte bei Bruttemperatur nie früher als am 6. Tage.

Diese gegenüber *B. coli commune* verspätet eintretende Säurebildung ist aus den folgenden Tabellen zu ersehen.

Es wurden je 50 ccm sterile Molke und Milch mit der gleichen Menge (2 Tropfen) einer 24-stündigen Bouillonkultur unseres Stammes geimpft und zum Vergleich in genau derselben Weise Kulturen von *B. coli commune* angelegt. In Intervallen von 1 bis 2 Tagen wurde durch Titration mit n/10-Natronlauge die Azidität bestimmt (Indikator: Phenolphthalein).

1) Molke, am 20. Juni 1908 geimpft

	unser Stamm	Coli	Kontrolle (sterile Molke)
21. Juni	Azid. = 8,7	16,0	3,9 ccm n/10-Lauge
22. "	" = 6,2	20,0	
23. "	" = 6,7	20,0	
24. "	" = 5,0	19,5	
26. "	" = 16,7	19,0	
29. "	" = 15,5	18,0	4,0 " "

2 a) Milch, am 20. Juni geimpft

	unser Stamm	Coli	Kontrolle (sterile Milch)
21. Juni	Azid. = 19,0 (keine Gerinn.)	28,3 (Gerinnung)	13,1 ccm n/10-Lauge
22. "	" = 18,0	29,5	
23. "	" = 16,8	33,8	
24. "	" = 23,0	35,0	
26. "	" = 32,0 (Gerinnung)	35,0	12,0 " "
27. "	" = 32,0	35,0	

2b) Milch, am 9. Juli geimpft

		unser Stamm	Coli	Kontrolle (sterile Milch)
10. Juli	Azid. =	21,0 (keine Gerinn.)	31,0 (Gerinnung)	13,0 ccm n/10-Lauge
11. "	" =	18,0	34,0	
12. "	" =	19,0	34,0	12,0 " "
13. "	" =	20,5	33,5	
14. "	" =	32,0 (Gerinnung)	34,0	13,0 " "
15. "	" =	29,5	32,0	

Die Bestimmung der flüchtigen Fettsäuren in der geronnenen Milch ergab ein Gemenge von Butter-säure und Propionsäure.

Ueber diesbezügliche vergleichende Untersuchungen an verschiedenen Stämmen der Coli-Typhus-Gruppe werden wir an anderer Stelle berichten.

Ueber die chemischen Leistungen gegenüber verschiedenen Zuckerarten sei noch im Zusammenhang folgendes berichtet.

Auf Nutroseagarplatten mit 15-proz. Lackmuslösung und 1,5 Proz.

	Glukose erfolgte	Rötung
Galaktose	"	"
Fruktose	"	"
Laktose	"	keine Rötung
Saccharose	"	"
Maltose	"	leichte Rosafärbung
Mannit	"	nur stellenweise Rötung

In Lackmusagarschüttelkulturen mit 1,5 Proz.

Saccharose	} erfolgte nach 48 Stunden geringe Rötung und Bildung spärlicher Blasen
Laktose	
Glukose	
Galaktose	} erfolgte Rötung und Zersprengung nach 12 Stunden
Fruktose	
Maltose	
Mannit	

Zur Prüfung der Tierpathogenität wurden Mäuse, Meerschweinchen und Kaninchen verwendet. In dem Herzblut und in den entzündlichen Produkten der gefallenen Tiere fand sich stets unser Stamm rein.

Mäuse verendeten nach intraperitonealer Injektion von 0,3 ccm einer 48-stündigen Bouillonkultur in 8–10 Stunden an diffuser Peritonitis.

Meerschweinchen verendeten noch nach intraperitonealer Injektion von 0,1 ccm einer 24-stündigen Bouillonkultur nach 10 Stunden. Erst 0,01 ccm wurde ohne Krankheitserscheinungen vertragen.

Kaninchen zeigten nach subkutaner Einverleibung Absceßbildung.

Hieraus ergibt sich somit eine gegenüber *Bact. coli commune* wesentlich gesteigerte Tierpathogenität.

Ebenso waren die aus Niere und Blase gezüchteten anaeroben Stämme mit dem aus dem Harn intra vitam gewonnenen identisch. Schon das mikroskopische Aussehen dieses grampositiven Stäbchens schien dem im Säuglingsstuhl so häufig zu findenden, von Tissier beschriebenen *Bacillus bifidus communis* zu entsprechen.

Dieselbe Uebereinstimmung konnten wir nun auch im kulturellen Verhalten finden. Der Bacillus war ein obligates Anaërobion. Es gelang uns nie ein sicheres Wachstum unter aëroben Verhältnissen, wie dies Jacobson beschrieben hat, zu erzielen, obwohl wir mehrmals Traubenzuckerbouillon, in der üppiges Wachstum erfolgt war, in größerer Quantität auf schrägen Traubenzuckeragar brachten und diese Kulturen monatelang beobachteten.

Es gelang uns übrigens auch nicht, trotz wiederholter Versuche, ein Oberflächenwachstum dieses Stammes unter anaëroben Verhältnissen zu erzielen: weder bei Verwendung des Botkinschen Apparates in der von Ghon und Sachs angegebenen Anordnung, noch im Kamenschen Topf, während andere *Bifidus*-Stämme unter diesen Bedingungen wuchsen.

In hochgeschichteten Traubenzuckeragarschüttelkulturen wuchs der Stamm nur in der Tiefe; es erschien nach 2–3 Tagen, wenn reichlich verimpft wurde, an der Grenze der „Zone aëré“, wie dies Tissier beschrieben hat, ein Ring, der sich aus zahlreichen kleinsten Kolonien zusammensetzte. Die Einzelkolonien erreichten mitunter einen Durchmesser von 4 mm und zeigten eine weißliche Farbe. In langhalsigen Kolben mit

Traubenzuckerbouillon, die vor dem Beimpfen gut ausgekocht worden war, wuchs der *Bacillus* reichlich unter Trübung und Bildung eines dicken, weißlichen Bodensatzes. Ebenso gut wuchs unser Stamm in Nutrosca-arschüttelkulturen mit 15-proz. Lackmuskultur und 1,5 Proz. Laktose, Galaktose, Lävulose und Mannit unter Rötung und nachfolgender Entfärbung des Nährbodens, ohne Gasbildung. In Milch erfolgte üppiges Wachstum und Gerinnung nach durchschnittlich 6—7 Tagen.

Zur Bestimmung der flüchtigen Fettsäuren nach der von A. Rodella angegebenen Methode wurden $2\frac{1}{2}$ l Milch am 13. Juni mit einer Reinkultur des grampositiven Stäbchens beimpft. Beginn der Gerinnung am 18. Juni. Am 23. Juni ist komplette Gerinnung eingetreten. Es wird vom Kaseinkuchen abfiltriert und das stark saure Filtrat mit Phosphorsäure (4 ccm einer Lösung 1:3 auf 100 ccm) versetzt. Nach mehrstündigem Stehen werden die flüchtigen Säuren durch Wasserdampfdestillation abgeschieden, bis das Destillat mehr als die doppelte Menge des Filtrats beträgt. Es wird mit Barytwasser alkalisch gemacht, der überschüssige Baryt durch Einleiten von CO_2 und Filtration entfernt, die Lösung der Baryumsalze zum Sirup eingedampft, dieser in 20 ccm Wasser gelöst und das Filtrat mit je 2—3 ccm normaler AgNO_3 -Lösung fraktioniert gefällt.

Die Ag-Bestimmung in den einzelnen Fraktionen der im Vakuum über Schwefelsäure getrockneten Silbersalze ergibt folgende Zahlen:

1) 67,05 Proz. Ag	6) 65,70 Proz. Ag
2) 67,24 " "	7) 64,70 " "
3) 65,65 " "	8) 64,88 " "
4) 65,00 " "	9) 65,38 " "
5) 65,70 " "	

Die Zahlen liegen dem Wert der Essigsäure (64,66 Proz.) am nächsten.

Daraus geht hervor, daß als einzige flüchtige Fettsäure Essigsäure gebildet wurde, was mit den Angaben Tissiers für seinen *Bac. bifidus communis* übereinstimmt. Eigenbewegung und Sporenbildung fehlte. Auch Tierpathogenität ließ sich nicht nachweisen weder gegenüber Mäusen noch Meerschweinchen oder Kaninchen. Insbesondere vertrugen die letzteren die intraperitoneale Injektion von Mengen bis zu 3 ccm von 3- und 16-tägigen Traubenzuckerbouillonkulturen ohne Krankheitserscheinungen.

Wenn wir den Verlauf des Falles nochmals in Kürze überblicken, ergibt sich folgendes:

Ein 2 Monate alter, von Geburt an künstlich ernährter, verhältnismäßig gut entwickelter Knabe erkrankt akut unter den klinischen Erscheinungen eines Icterus catarrhalis. Die etwa eine Woche nach Beginn der Erkrankung vorgenommene Harnuntersuchung ergibt das Bestehen einer Cystitis. Der Ikterus verliert sich nach 10—14 Tagen allmählich. Die Symptome der Cystitis halten trotz Verabreichung von Urotropin unverändert an. Dabei Blässe, unregelmäßiges re- und intermittierendes Fieber, Gewichtsstillstand, später Abnahme, Entwicklung bronchopneumonischer Herde. Nach einigen Wochen läßt die Zunahme des Eiweißes und das Auftreten von Zylindern im Harn ein Fortschreiten des Prozesses auf die Nieren erkennen. Unter rasch zunehmendem Verfall erfolgt am 42. Krankheitstage der Tod. Die Sektion ergibt: Cystitis, Pyelonephritis, rekrudeszierender Darmkatarrh.

Die bakteriologische Untersuchung des Harns und (nach dem Tode) der Niere, Blase und Milz ergibt ein durch sein mikroskopisches Aussehen, sein Wachstum auf Gelatine und seine Fähigkeit, Traubenzucker zu vergären und Indol zu bilden, dem *Bacterium coli commune* nahestehendes Bakterium, das sich von diesem aber durch das Fehlen der Eigenbewegung und der Rötung von Lackmuskmilchzuckeragarplatten, durch die verspätete Gerin-

nung der Milch und die höhere Tierpathogenität unterscheidet. Stellen wir uns auf den Standpunkt, den außer Gilbert in neuerer Zeit Blumenthal und Hamm eingenommen haben, nur diejenigen Stämme als *Bacterium coli commune* zu bezeichnen, die sämtliche von Escherich als typisch angegebenen Merkmale besitzen, alle anderen Stämme jedoch als Paracoli-Stämme abzutrennen, so werden auch wir unseren Stamm am besten in die Gruppe der Paracoli-Stämme einreihen, wenn nicht der Mangel der Beweglichkeit sogar Veranlassung geben könnte, das Stäbchen einer besonderen Gruppe zuzuweisen. Neben diesem Stamm findet sich im Harn und nach dem Tode in Niere und Blase mikroskopisch und kulturell ein mit dem *Bacillus bifidus communis* Tissier identisches Stäbchen.

Die bei der epikritischen Betrachtung des Falles zunächst sich aufdrängende Frage ist die nach der pathogenetischen Bedeutung der gefundenen Bakterien. Bezüglich des gramnegativen Stäbchens läßt sich diese Frage wohl ohne weiteres in positivem Sinne beantworten, da verwandte Arten als Erreger von Cystitis und Pyelonephritis schon häufig beschrieben worden sind. Wir brauchen nur auf die seit Escherichs Untersuchungen so oft bei Mädchen beobachtete Cystitis durch *Bacterium coli commune* zu verweisen und daran zu erinnern, daß auch Typhus- und Paratyphusbacillen (Achard und Bensaude) eine Cystitis hervorrufen können. Schließlich wurden auch „Paracoli-Bacillen“ bei Cystitis gefunden. Achard und Renault fanden unter 10 Stämmen, die von Infektionen der Harnorgane stammten, 2 Stämme, die sich sowohl vom *Bact. coli commune* als auch vom *Bact. lactis aërogenes* dadurch unterschieden, daß sie kein Indol und in Milchsuckerbouillon kein Gas bildeten, und einen Stamm, dessen Milchkultur nur beim Erhitzen gerann; diese Stämme wurden später von Gilbert unter die „Paracoli-Bacillen“ gerechnet und bei der Aufstellung von 5 Gruppen dieser Mikroorganismen verwertet. Ebenfalls über Paracoli-Bacillen bei Cystitis berichten ferner Allen, Mair, Münz, Blumenthal und Hamm.

Bezüglich der Bedeutung des *Bacillus bifidus communis* wurde namentlich von französischen Autoren (Hartmann und Roger, Albarran und Cottet) auf die Rolle der Anaëroben bei den Erkrankungen der Harnorgane hingewiesen und von den letztgenannten Autoren der Tissiersche *Bacillus* in einem Falle isoliert. Ferner wurde an der Grazer Klinik des Professors Escherich ein hierher gehöriger Fall von Cystopyelitis beobachtet, der bisher nicht veröffentlicht wurde. Wie sich aus den Abbildungen ergibt, die der Sammlung der hiesigen pädiatrischen Klinik angehören, fand sich im Harnsediment des 9 Monate alten Mädchens ein mit dem unserigen allem Anschein nach übereinstimmendes grampositives Stäbchen.

Wenn schließlich, wie jüngst Rodella behauptet hat, der *Bacillus bifidus communis* mit dem *Bacillus acidophilus* und *gastrophilus* identisch ist, so müssen wir hier auch die Beobachtungen von Rudinger und Latzel über das Vorkommen von Milchsäurebacillen im Harnsediment berücksichtigen. Es wäre demnach in unserem Falle ebenso wie für den *Paracolibacillus* auch für den *Bacillus bifidus* eine pathogenetische Bedeutung anzunehmen.

Auf welche Weise jedoch diese Mikroorganismen in die Blase oder überhaupt in die Harnorgane gelangten, läßt sich nicht mit Sicherheit

sagen. Nur für die Cystitis der Mädchen erscheint der Weg von außen durch die kurze weibliche Urethra als der wahrscheinlichste. Bezüglich der Infektionswege bei Knaben, bei denen man, wie bei dem unserigen, eine Infektion durch Katheterismus ausschließen kann, kommen vielmehr nach Escherich zwei andere Möglichkeiten in Betracht. Entweder können die Bakterien mit dem Blutstrom in die Niere und von dort in die Harnwege gelangen, oder von dem benachbarten Darmkanale her, der ja beim männlichen Geschlecht in beträchtlicher Ausdehnung der hinteren Blasenwand anliegt, durch die Wandung der Blase hindurch einwandern. Der letztere Weg ist nach Escherich der gewöhnliche, vorausgesetzt, daß durch vorausgegangene entzündliche Veränderungen im untersten Abschnitt des Darmkanals das Epithel zerstört ist, während der hämatogene Weg nur in seltenen Fällen zutreffen soll. Dieser Infektionsmodus entspräche den Ansichten über Entstehung der Bakteriurie und Cystitis bei Typhus, bei welcher Erkrankung nach den neueren Erfahrungen ja meist eine Bakteriämie nachweisbar ist. Auf welchem dieser beiden Wege in unserem Falle die Infektion stattgefunden hat, läßt sich, wie gesagt, wohl nicht entscheiden.

Hämatogene Infektion vorausgesetzt, müßten wir annehmen, daß es sich um eine in schweren Allgemeinerscheinungen und Ikterus sich manifestierende Infektion vom Darm aus gehandelt habe, die durch Bakteriämie zu Bakteriurie, Cystitis und Pyelonephritis führte. Beweisbar wäre diese Annahme nur durch den Nachweis der Mikroorganismen im kreisenden Blute vor Eintritt der Cystitis. Die andere Möglichkeit, den Weg per continuitatem, vorausgesetzt, müßte ein Darmkatarrh — und Residuen eines solchen waren ja in unserem Fall anatomisch nachweisbar — einerseits zu katarrhalischem Ikterus, andererseits zu einem Ueberwandern der Bakterien durch die geschädigte Darmschleimhaut in die Blase Veranlassung gegeben haben. Beweisen läßt sich auch diese Annahme nicht, jedoch erscheint sie uns ungezwungener.

Ob bei der Entstehung des Ikterus einer der von uns gefundenen Bakterien eine besondere Rolle zukam, kann auch nur Gegenstand von Vermutungen sein. Immerhin ist man wohl bei dem heutigen Stand unserer Kenntnisse über die Beziehungen der Coli-Typhusgruppe zu den Erkrankungen der Gallenwege berechtigt, daran zu denken.

Sicher erscheint uns nur, daß der Darm als Infektionspforte zu betrachten ist, wenn es auch nicht gelang, die in der Blase gefundenen Bakterien aus dem Heere der Darmbakterien zu isolieren.

Literatur.

- Albarran, J., et Cottet, J., Le rôle des microbes anaérobies dans l'infection urinaire. (*La Presse méd.* 1903. p. 85.)
 Achard et Renault, Société de biologie. 17 déc. 1892; ref. *Semaine méd.* 1892. p. 512.
 Allen, Paracolon infections, with report of three cases. (*Americ. Journ. of Med. Sc.* 1903. Jan.; ref. *Centralbl. f. Bakteriöl. Abt. I. Bd. XXXIV.* 1903. p. 508.)
 Blumenthal und Hamm, Bakteriologisches und Klinisches über Coli und Paracoli-Infektionen. (*Mitteil. a. d. Grenzgeb. d. Med. u. Chir. Bd. XVIII.* p. 642.)
 Escherich und Pfandl, *Bacterium coli commune.* (Kolle und Wassermann, *Handbuch der pathogenen Mikroorganismen.*)
 Ghon und Sachs, Ueber die anaérobe Züchtung. (*Centralbl. f. Bakteriöl. Abt. I. Bd. XXXII.* 1902. p. 403.)
 Gilbert, De la colibacillose. (*Semaine méd.* 1895. p. 1.)
 Hartmann, H., et Roger, H., Contribution à l'étude bactériologique des cystites. (*La Presse méd.* 1902. p. 1287.)

- Jacobson, G., Contribution à l'étude de la flore normale des selles du nourisson. (Annal. de l'Inst. Pasteur. 1908.)
 Latzel, Ueber das Vorkommen von Milchsäurebacillen im Harnsediment. (Wiener klin. Wochenschr. 1906. p. 1479.)
 Mair, Note on a Paracolonbacillus found in the urine. (Brit. med. Journ. 1906. p. 2356.)
 Münz, Mitteilungen der Gesellschaft für innere Medizin und Kinderheilkunde in Wien, Sitzung v. 14. Dez. 1905.
 Rodella, A., Sur la différenciation du „Bacillus putrificus“ (Bienstock) et des bacilles anaérobies tryptobutyriques (Achalme). (Annal. de l'Inst. Pasteur. 1905. p. 804.)
 — —, Magencarcinom und Milchsäurebacillen (Boas-Opplerscher Bacillus, Bacillus gastrophilus, Bacillus acidophilus und Bacillus bifidus communis. (Centralbl. f. Bakteriologie. Abt. I. Orig. Bd. XLVII. p. 445.)
 Rudinger, Centralbl. f. inn. Med. 1904. No. 5.)
 Tissier, H., Recherches sur la flore intestinale normale et pathologique du nourisson. Paris 1900.
 — —, Repartition des microbes dans l'intestin du nourisson. (Annales de l'Inst. Pasteur. T. XIX. p. 109.)

Nachdruck verboten.

Antwort auf die Bemerkungen des Herrn Prof. Babes im Centralblatt für Bakteriologie. Bd. XLVIII. Heft 5.

Von Dr. B. Lipschütz in Wien.

In „Bemerkungen über einige Angaben in der Arbeit Lipschütz, Ueber mikroskopisch sichtbare, filtrierbare Virusarten“ veröffentlicht Herr Prof. Babes eine Reihe von Berichtigungen, die mich zu einer kurzen Antwort veranlassen. Herr Prof. Babes behauptet, die von ihm bei Lyssa beschriebenen Granula nicht nur nach Ramón y Cajal — wie ich es in meiner Arbeit angeführt habe — dargestellt, sondern sie auch nach anderen Methoden, so nach Löffler und nach Giemsa gefärbt zu haben. Daß ich seine Befunde nicht bestätigen konnte, meint Herr Prof. Babes dadurch erklären zu können, daß ich mich bei meinen Untersuchungen einer minderwertigen Methode bedient habe.

Auf diese Bemerkungen möchte ich mir nun erlauben, hauptsächlich auf Grund der von Herrn Prof. Babes veröffentlichten Arbeiten, meinen bereits in einer früheren Arbeit¹⁾ fixierten Standpunkt nochmals hervorzuheben und Belege für die Richtigkeit desselben zu bringen.

1) Meine Behauptung, Herr Prof. Babes habe die Granula nur nach Ramón y Cajal und nicht auch nach anderen Methoden (Löffler oder Giemsa) gefärbt, stützt sich auf das Studium und den Vergleich beider von Herrn Prof. Babes zitierten Arbeiten: Zeitschrift für Hygiene und Infektionskrankheiten. Bd. LVI. 1907 und Atlas für pathologische Histologie des Nervensystems, Lieferung VII. Tafel IV. 1896. Der Vergleich der Fig. 4 auf Tafel IV (eine andere Figur kann wohl nicht gemeint sein) mit den Abbildungen aus der Zeitschrift für Hygiene zeigt, daß äußerst auffallende Formen- und Größenunterschiede bestehen, die nicht vernachlässigt werden können. Denn die bei 500facher Vergrößerung wiedergegebenen roten Granula (Taf. IV. Fig. 4) sind um mehr als das Doppelte größer als die kleinen, punktförmigen, schwarzen bei einer

1) Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. XLVIII. 1908. Heft 1.

stärkeren¹⁾ Vergrößerung abgebildeten Granula, z. B. auf Tafel VI, in der Zeitschrift für Hygiene. Es hieße doch den Verhältnissen Gewalt antun, wollte man ohne weitere Kritik diesen merkwürdigen Unterschied vernachlässigen und die Identität der Granula proklamieren. Daß aber Herr Prof. Babes selbst in seiner 1896 erschienenen Arbeit gar nicht daran dachte, die rot gefärbten Granula als Virus aufzufassen, geht am besten aus dem begleitenden Text hervor, den ich hier unverkürzt wiedergebe.

Die Erklärung der Fig. 4 Taf. IV im Atlas für pathologische Histologie des Nervensystems, Lieferung VII 1896 lautet:

„Fig. 4. Ein Wutknötchen im Vorderhorn des Rückenmarkes. Härtung in Flemmingscher Lösung. Löfflers Anilin-Rubin und Tanninlösung. Vergrößerung 500²⁾).

Eine große Nervenzelle *ns* ist von einem erweiterten sinuösen pericellulären Raum umgeben, in welchem rote Granulationen und zahlreiche Kerne liegen.

Die Zelle selbst ist undeutlich begrenzt; in der Umgebung derselben findet sich eine bedeutende Anhäufung mononukleärer Zellen sowie kleine hyaline Schollen, ferner dunkelrote Granulationen *g* und Stäbchen, endlich keratinoide Fäden und Schollen³⁾ namentlich entartete sinuöse Lymphräume (*v*) auskleidend.

Ein kleinerer Knoten findet sich in der Umgebung einer hyalin³⁾ entarteten Nervenzelle *ns'*, in welcher noch von einer hellen Zone umgebene hyaline¹⁾ Körperchen liegen. Auch diese Zelle ist von einer Zone von mononukleären Rundzellen umgeben.“

Es ist gewiß sehr merkwürdig, daß Herr Prof. Babes heute auf eine vor 12 Jahren erschienene Arbeit verweist und die damals gegebene Deutung der Granula als hyaline Körnchen, Fäden, Stäbchen und keratinoide Schollen nunmehr ändert und hyaline Granula zum Virus der Lyssa in Beziehung zu bringen sucht. In der neuen Arbeit (1907) vermissen wir aber jede Andeutung über wieder vorgenommene und gelungene Färbungen nach Löffler, sowie Abbildungen von nach Löffler dargestellten Körperchen.

Herr Prof. Babes hat aber in seiner Arbeit auch nirgends den exakten Beweis geführt, daß es ihm gelungen sei, seine schwarzen Granula (Silberimprägnation nach Ramón y Cajal) auch allein nach Giemsa zu färben. Denn in dem Resumé der Arbeit heißt es ausdrücklich: „... bestimmte bei Wut auftretende feinste Körperchen, welche sich nach Cajal-Giemsa schwarz oder blau färben“, und auf p. 445 spricht Herr Prof. Babes von Körnchen, die er in nach Ramón y Cajal behandelten Schnitten angetroffen hat, und welche, wenn er sie nach Giemsa intensiv nachgefärbt hatte, entweder schwarz oder blau gefärbt waren.

Nun glaubt allerdings Herr Prof. Babes, diese Körnchen mit solchen, die er nach Giemsa bei starker Vergrößerung (Apochromat 2 mm und Okular 8 mm) schwärzlich, bläulich oder grünlich, von einer blassen Zone umgeben, angetroffen hat (p. 445 oben), identifizieren zu können, und des weiteren identifiziert Herr Prof. Babes auch seine nach Cajal imprägnierten Körnchen mit den nach Beizung rot gefärbten

1) Herr Prof. Babes hat es leider unterlassen, die genaue zahlenmäßige Vergrößerung bei mehreren Figuren der Taf. VI anzugeben.

2) Von mir gesperrt gedruckt.

3) Von mir gesperrt gedruckt.

Granula (Fig. 4, Taf. IV, Lief. VII, Atlas für pathologische Histologie des Nervensystems), von welchen ich bereits angeführt habe, daß Herr Prof. Babes sie vor Jahren als hyaline Degenerationsprodukte bezeichnet hatte.

Aus diesen Ausführungen geht hervor, daß Herr Prof. Babes seine silberimprägnierten Schnitte einer Nachfärbung mit Giemsa-Lösung unterworfen hat, und ferner, daß, wenn er auch nach Giemsa gefärbte Granula gesehen hat, er jedenfalls den Beweis der Identität — und dies ist ja der wichtigste Punkt — all' dieser Granula schuldig geblieben ist.

Es erscheint mir sehr fraglich, ob es mit Hilfe der bisher benützten Methoden überhaupt möglich ist, diesen Beweis zu erbringen.

2) Herr Prof. Babes macht mir den Vorwurf, mich beim Studium der Lyssa einer „minderwertigen“ Methode bedient zu haben. Darauf möchte ich nur erwidern, daß diese „minderwertige“ Methode seit Robert Koch in allen bakteriologischen Laboratorien als wichtigstes Verfahren des Nachweises von Mikroorganismen — und nur darum allein und nicht etwa um feinste histologische Details handelt es sich in der uns hier beschäftigenden Frage — gelehrt und geübt wird. Nicht nur fast sämtliche bisher bekannten Mikroorganismen sind mit Hilfe der Untersuchung des gefärbten Deckglasausstriches entdeckt worden, sondern gerade auf dem derzeit schwierigsten Kapitel mikroskopisch-bakteriologischer Forschung ist es Nocard und Roux, Borrel, mir, Halberstädter und v. Prowazek, Greef und Clausen, Paschen, v. Prowazek und Beaurepaire, Volpino mit Hilfe der genannten Methode gelungen, das Virus der Peripneumonie der Rinder, der Taubentpocke, des Moluscum contagiosum des Menschen, des Trachoms, der Vaccine, der Variola und der Ovine in seiner mikroskopischen Form zur Darstellung zu bringen, nachdem alle anderen Methoden in jahrzehntelanger emsiger Forschung zahlreicher hervorragender Autoren völlig versagt hatten. Es ist nicht einzusehen, warum diese Methode, die von mir zuerst beim Studium der Lyssa systematisch, allerdings ohne zu eindeutigen Resultaten geführt zu haben¹⁾, angewendet wurde, versagen soll, nachdem sie sich, wie ich eben angeführt habe, so außerordentlich bewährt hat.

3) Am Schlusse dieser Auseinandersetzungen möchte ich mir erlauben, noch einiges über die eventuelle Bedeutung der von Herrn Prof. Babes beschriebenen und abgebildeten Granula bei Lyssa zu erwähnen. Auf p. 445 lesen wir zwar, daß die schwarzen Körnchen ungemein fein, nicht sehr scharf umschrieben und gleichmäßig groß sind. Die Besichtigung der Taf. VI zeigt jedoch, daß auch bräunliche, plumpe Körnchen und selbst kurze, stäbchenförmige Gebilde (z. B. Fig. 12 bei C' oder Fig. 11 bei C VI), die sich also durch Form, Größe und Verhalten bei der Silberimprägnation von den gemeinten schwarzen Körnchen sehr leicht unterscheiden lassen, von Herrn Prof. Babes ebenfalls als möglicherweise zum Lyssavirus in Beziehung stehende Granula aufgefaßt werden. Bei dieser Sachlage glaube ich, daß den silberimprägnierten Granula so lange keine Bedeutung etwa im Sinne eines Virus beigelegt werden darf, bis es gelungen sein wird, die fraglichen Körperchen auch im gefärbten Ausstrich einer verdünnten Lyssaemulsion mit echten

1) Nach dem Stande meiner Untersuchungen im Jahre 1908. Ueber in den letzten Monaten vorgenommene spezielle Beizverfahren und deren Resultate hoffe ich später berichten zu können.

Färbungsmethoden (und nicht Silberimprägnationsverfahren) zur Darstellung zu bringen. Die Methode von Ramón y Cajal, die beim Studium des Nervensystems und in der letzten Zeit auch bei dem der Syphilis so Vorzügliches geleistet hat, ist gerade für die mikroskopische Darstellung von an der Grenze des Sichtbaren befindlichen korpuskulären Elementen ganz ungeeignet, falls nicht gleichzeitig eine Ergänzung und Kontrolle des Gesehenen durch das native Präparat und durch echte Färbungsmethoden gebracht werden können.

Wien, 1909.

Nachdruck verboten.

Beitrag zur Aetiologie der Windpocken.

[Aus dem Institut für Hygiene der Kgl. Universität Parma.]

Von Prof. E. Bertarelli.

Ins Deutsche übersetzt von Dr. K. Rühl-Turin.

Mit 1 Tafel.

Die Existenz der Windpocken als einer bestimmten und selbständigen Krankheit wird heutzutage von der großen Mehrzahl der Autoren nicht mehr angezweifelt; es sprechen zu viele Gründe gegen die Annahme, daß es sich bei der Varicella um eine milde Form (Variolois), oder um eine besondere Varietät der echten Pocken handle.

Alle klinischen und experimentellen Beobachtungen zwingen uns dazu, einer solchen einheitlichen Auffassung jeden Wert abzusprechen.

Allein die von Bett¹⁾ genau beobachteten 3 Fälle, in welchen die Windpocken nach positiv ausgefallener Vaccination auftraten, würden genügen, um schwere Zweifel über eine eventuelle Identität der Varicella mit der Variola zu erwecken. Es haben übrigens auch andere Autoren, vielleicht nicht mit solcher Sorgfalt und Genauigkeit wie Bett, über Fälle berichtet, in welchen vor kurzem geimpfte Menschen von den Windpocken befallen wurden. Es sei z. B. Halbhuter²⁾ erwähnt, welcher solche Fälle beobachtet hat.

Comby³⁾ führt in seiner Abhandlung über Varicella, vielleicht der vollständigsten und sorgfältigsten über diesen Gegenstand, welche in medizinischen Werken erschienen ist, weitere sehr beweiskräftige Betrachtungen an, welche für die Nichtidentität der zwei Formen sprechen. Er erinnert sich, im Hôpital St. Louis in Paris 1885 zwei Patienten (Mutter und Sohn) gesehen zu haben, welche wegen einer Windpocken-eruption ins Krankenhaus zu einer Zeit aufgenommen wurden, wo sich in demselben auch an echten abgeschwächten Pocken kranke Patienten befanden. Während nun diese zwei Varicellakranken auf dem Wege der Heilung waren, wurden sie von einer typischen Pockeninfektion befallen.

Oettinger⁴⁾ berichtet auch über einen ähnlichen Fall.

1) Wien. med. Wochenschr. 1905. Heft 10.

2) Wien. med. Wochenschr. 1905. Heft 7.

3) Comby, J., Varicelle. Traité des maladies de l'enfance, Grancher, Comby et Mossou. Paris (Masson) 1897.

4) Oettinger, Semaine méd. 1894.

Die Verfechter der einheitlichen Aetiologie der beiden Krankheiten haben nie einen annehmbaren und einwandfreien Beweis der Identität der Varicella mit der Variola geführt. Einige von ihnen, wie Talamone¹⁾, sprechen zwar von Varicellaepidemien, welche mit Pockenkrankheit endigten, aber, abgesehen von der Möglichkeit eines gleichzeitigen (auch von mir beobachteten) Bestehens beider Krankheiten bei einem Individuum, geht aus ihren Behauptungen nicht hervor, daß man dieselben ohne weiteres als gültig anerkennen muß.

Das gleiche gilt für Bartler und Rilliet, Barin, Hebra und für die jüngeren Behauptungen von Swoboda²⁾, bei denen man vergebens einen dokumentierten und einwandfreien Beweis der von ihnen behaupteten einheitlichen Aetiologie suchen würde.

Die einzige Behauptung, die man als richtig ansprechen kann, ist folgende: Daß die Diagnose der Varicella und die Differentialdiagnose zwischen derselben und gewissen Variolafällen nicht immer leicht ist.

Die epidemiologischen Charaktere, welche gewöhnlich angegeben werden, daß Varicella nur Kinder und Variola Leute jeden Alters befällt, haben keinen großen Wert. Ich habe 1906 in Settimo Torinese während einer Windpockenepidemie eine 40-jährige Frau gesehen, welche von dieser Krankheit befallen war; später habe ich noch mehrere 18–20-jährige Varicellakranke gesehen. Bei Erwachsenen weist die Krankheit gewöhnlich einen milderen Verlauf auf, mit geringer Erhöhung der Temperatur und ohne bemerkenswerte Allgemeinsymptome, so daß diese Fälle leicht der ärztlichen Beobachtung entgehen.

Die klinischen Charaktere haben einen größeren Wert; ich habe mich jedoch bei Untersuchung einiger hundert Fälle nicht von ihrer absoluten Konstanz und ihrer praktischen Anwendbarkeit zu einer sicheren Diagnose überzeugen können.

Die Dauer der Inkubationsperiode der Varicella ist sehr umstritten. Heilly behauptet, daß die Inkubation 3–7 Tage dauert, Steiner 8, Comby 14, Gerhardt 14–15 Tage; Day³⁾ hat jüngst festgestellt, daß die Inkubationsdauer 27 Tage beträgt.

Diese Angaben haben aber, bei der großen Schwierigkeit, um nicht zu sagen Unmöglichkeit, die Krankheit experimentell hervorzurufen, keinen großen Wert.

Während der letzten 4 Jahre habe ich mit der größten Sorgfalt alle Windpockenepidemien der Provinz Turin und die Endemie von Parma verfolgt. Ich habe 3 Krankheitsgeschichten zusammenstellen können, die sich auf Personen beziehen, welche aus varicellafreien Gegenden herkamen, in Häuser eintraten, wo sich Varicellakranke befanden, und selbst von der Krankheit befallen wurden: 2 dieser Fälle beobachtete ich in Settimo Torinese in zwei verschiedenen Epidemien (1906 und 1907) und den dritten in Parma (1908).

Im ersten Falle brach die Krankheit 8 Tage nach der Ankunft des betreffenden Kindes in dem Hause aus, wo sich bereits 2 Varicellakranke befanden; daraus kann man also schließen, daß die Inkubation entweder 8 Tage oder weniger, jedenfalls nicht länger gedauert hatte.

Im zweiten Falle hatte die Inkubation nicht mehr als 10 und im dritten nicht mehr als 7 Tage und möglicherweise kürzer gedauert.

1) Siehe Lehrbuch von Comby.

2) Verhandl. d. 19. Versamml. d. Ges. f. Kinderheilk. Wiesbaden 1903.

3) Brit. med. Journ. 1903.

Der Inkubation folgt eine Invasionsperiode, welche 1—2 Tage dauert. Die Temperatur erhöht sich rasch und erreicht $38,5^{\circ}\text{C}$, zuweilen auch $39,5\text{—}40^{\circ}\text{C}$; dieser Anstieg der Temperatur ist von einigen allgemeinen Symptomen begleitet, welche nichts Spezifisches darbieten (Rachialgie, diffuse Schmerzhaftigkeit, Erbrechen usw.). Manchmal erscheint sehr bald ein scharlachförmiger Ausschlag, welcher jedoch in anderen Fällen ausbleibt.

Am 2. oder 3. Tage kommt das Exanthem zum Vorschein. Der Sitz desselben hat eine gewisse Bedeutung. Es ist besonders am Kopf, am Rumpf und an den Armen lokalisiert, jedoch in unregelmäßiger Weise verteilt. Die Eruption nimmt sehr rasch ein blasiges (resp. bullöses) Aussehen an; während bei der Variola sich die Eruption mit roten, abgespitzten Papeln mit harter Basis ankündigt, beobachtet man bei der Varicella längliche Blasen mit Erhöhung der oberen Schichten des Derma. Die seröse Flüssigkeit sammelt sich in den oberflächlichen Schichten der Epidermis an, und die Blasen bieten das Aussehen von hellen, durch eine fast durchsichtige Schicht bedeckten Tropfen.

Unter den befallenen Zonen zeigt die behaarte Kopfhaut oft ein charakteristisches Aussehen; diese Erscheinungen auf der Kopfhaut sind auch diejenigen, welche am längsten dauern. In einigen Fällen findet man flache, schmerzhaft Bläschen an den Füßen, mit einer rötlichen Basis.

Die Bläschen sind nur selten sehr zahlreich; ich habe zwar in Parma Kinder mit einigen Tausenden von Bläschen gesehen; in den meisten Fällen ist ihre Zahl jedoch eine sehr beschränkte.

Nach einigen Tagen geht die Vesicula in das pustulöse Stadium über, und die Pusteln (welche, obwohl einige Autoren das Gegenteil behaupten, stellenweise genabelt sind) trocknen sehr rasch aus und hinterlassen einen kleinen Schorf, welcher sich dann ablöst und abfällt, ohne eine Narbe zu hinterlassen. Es sei jedoch hinzugefügt, daß die Form, der Sitz und die morphologischen Besonderheiten der verschiedenen Erscheinungen wegen ihrer Inkonstanz keinen großen Wert haben können.

Bestimmt und konstant ist dagegen, daß bei den Pocken die Pusteln sich im Derma vertiefen, während die Läsionen bei der Varicella stets oberflächlich sind.

Die Nebenerscheinungen bei Windpocken (Zahnfleischentzündung, Pharyngitis, Stomatitis) können zur Differentialdiagnose wenig beitragen, weil man sie auch bei den Pocken beobachten kann.

Ich habe alle diese Einzelheiten erwähnt, weil man bei experimentellen Untersuchungen über eine Krankheit, wie die Varicella, sofort auf die Schwierigkeit stößt, eine sichere Diagnose zu stellen; und bei dem vollständigen Fehlen von experimentellen spezifischen Daten (ich konnte, weil diesbezügliche Beobachtungen fehlten, nicht a priori annehmen, daß beim Kaninchen nach Ueberimpfung der Varicella die Hornhautreaktion ausbleibt, und das Auftreten von Cytoryctes beobachtet wird) muß man sich vorläufig nur auf die klinische Diagnose stützen.

Wenige von den Ergebnissen meiner Untersuchungen haben den Wert positiver Tatsachen, und auf diese wenigen mache ich in besonderem Maße aufmerksam. Ich werde jedoch auch, wegen ihres biologischen und epidemiologischen Interesses, die negativen Resultate gewisser Versuche kurz erwähnen, welche mir wenigstens deshalb eine gewisse Bedeutung zu haben scheinen, weil sie erlauben, auf Grund experi-

menteller Ergebnisse den Unterschied zwischen der Varicella und den schweren und leichten Pocken festzustellen.

Uebertragbarkeit der Varicella.

Die Literatur ist sehr arm an Arbeiten über die Aetiologie der Windpocken und noch ärmer an Angaben über die Uebertragbarkeit der Krankheit auf den Menschen und auf Tiere.

Die ältesten mir bekannten Versuche sind diejenigen von Steiner und von Heilly¹⁾, welche 10 Kindern varicellöses Material inokulierten und dabei drei positive Resultate erhielten. Diese Versuche wurden aber in einem Hospital ausgeführt, in welchem sich zahlreiche Varicellakranke befanden, so daß man mit großer Wahrscheinlichkeit annehmen kann, daß die 3 an Varicella erkrankten Kinder nicht durch das eingepfachte Material, sondern durch andere Kranke infiziert worden sind. Diese Annahme scheint besonders durch die Tatsache gerechtfertigt, daß keine besondere Lokalisation der Krankheit an der Inokulationsstelle beobachtet wurde.

Vor kurzer Zeit hat Tyzzer²⁾ wiederholte Versuche mit der Einimpfung in die Hornhaut von Affen und Kaninchen gemacht, vielleicht von der beim Menschen mehrmals nachgewiesenen Möglichkeit (Oppenheimer)³⁾ von varicellösen Bläschen und Pusteln in der Hornhaut ausgehend. Die Resultate waren stets negativ.

Ich habe in verschiedener Weise und unter den verschiedensten Verhältnissen Versuche angestellt; dieselben fielen negativ aus, wenn man von einer geringen Trübung der Hornhaut beim Kaninchen absieht.

Im folgenden berichte ich kurz über meine Versuche:

Inokulation beim Menschen. — Ich habe an mir selbst den Versuch gemacht, und zwar mir einmal das Material einer kaum entstandenen Blase und ein anderes Mal dasjenige einer in der Austrocknung begriffenen Pustel in einen Arm inokuliert: In beiden Fällen fiel der Versuch negativ aus.

Ich habe den Versuch mit dem Diener des Institutes und mit einer 8-jährigen Nichte von mir wiederholt, aber stets mit negativem Resultat. Letzterer Versuch ist besonders interessant, weil das Kind 10 Tage nach dem Versuch geimpft wurde, und zwar mit positivem Resultat (das Kind war bereits im Alter von 7 Monaten geimpft worden). Aus meinen Resultaten kann man folgern: 1) daß die Einimpfung der Windpocken (Varicella) beim Menschen nicht sehr leicht gelingt; 2) daß man bei einem und demselben Menschen Unempfänglichkeit für Varicella und Empfänglichkeit für Pocken finden kann.

Nach diesen beiden Sätzen verliert die von gewissen Autoren behauptete Identität der Windpocken mit den Pocken jede Wahrscheinlichkeit, sowohl weil die Uebertragbarkeit der Pocken eine sehr hohe ist, diejenige der Varicella dagegen eine viel geringere zu sein scheint, als auch weil die Homologie, welche zwischen Pocken und Vaccine besteht, nicht zwischen Varicella und Vaccine nachzuweisen ist.

Inokulation bei Tieren. — Die verschiedenen Versuche, welche beim Makako ausgeführt wurden (Impfung auf die wundgemachte Haut,

1) Soc. méd. des hôpitaux. 1885.

2) Med. Records. 1907. 27. Nov.

3) Deutsche med. Wochenschr. 1905. No. 21.

auf die Hornhaut, auf die Bindehaut), sind in 2 Fällen negativ ausgefallen.

Die Versuche mit Hunden und Meerschweinchen (endovenöse Einspritzung beim Hund, Impfung auf die wundgemachte Hornhaut beim Hund und beim Meerschweinchen) hatten ebenfalls ein negatives Resultat.

Beim Kaninchen waren in einigen Fällen die Resultate etwas anders. Der von mir untersuchten Fälle von Varicella sind mehr als 200; die experimentellen Proben mit Kaninchen beziehen sich auf 15 Fälle.

Bei 5 Fällen mit klinisch gesicherter Diagnose bildete sich in der Hornhaut der Kaninchen an der Stelle der Inokulation eine geringe Infiltration, welche nicht der äußerst geringen und durch die Operation selbst hervorgerufenen reaktiven Infiltration zuzuschreiben war.

Für die Inkonzanz des Befundes weiß ich keine Erklärung zu finden: Die positiv ausgefallenen Versuche wurden in verschiedenen Zeitperioden vorgenommen und mit varicellösem Material aus fünf verschiedenen Quellen. Ich habe versucht, festzustellen, ob das Alter der varicellösen Läsion, von welcher das zur Inokulation verwendete Material her stammt, eventuell den Ausfall der Hornhautreaktion beeinflusst, habe aber keine positiven Schlußfolgerungen in diesem Sinne ziehen können.

Dagegen steht die Tatsache fest, daß man bisweilen mit varicellösem Material, auch wenn es sich um Serum der Bläschen oder um vom Grunde der Bläschen abgeschabtes Gewebe oder um keimfreien Eiter der Pusteln (in 4 Fällen unter 5 war in der Pustel kein Keim nachweisbar) handelt, eine Reaktion in der Hornhaut hervorruft, welche sich durch eine mehr oder weniger diffuse und intensive Trübung äußert, die mehrere Tage dauern kann.

In einigen seltenen Fällen bildet sich auch ein oberflächliches Geschwür mit unregelmäßigen Rändern, welches nach 5—6 Tagen verschwindet.

Diese geringe Reaktion kann man nicht mit der intensiven typischen der Vaccine verwechseln. Vielleicht könnte man in Fällen, wo die Differentialdiagnose zwischen Pocken und Windpocken Schwierigkeiten darbietet, das verschiedene Verhalten der Hornhaut gegen die Inokulation als einen Anhaltspunkt verwerten.

Mit dem mikroskopischen Befund dieser Hornhäute werde ich mich weiter unten beschäftigen.

Ich habe mir auch die Frage vorgelegt, ob es sich in diesen Fällen, welche beim Kaninchen ein positives Resultat ergeben hatten, nicht eventuell um eine milde Form von Pocken (Variolois) handle; deshalb bin ich nach der ersten Hornhautreaktion, welche ich beobachtete, sehr vorsichtig vorgegangen, und habe bei meinen Inkubationsversuchen alle Fälle verworfen, welche wegen ihrer klinischen Charaktere, oder wegen irgendeiner epidemiologischen Beziehung verdächtig oder zweifelhaft erscheinen konnten.

Ich muß deshalb schließen, daß die Befunde, welche ich beschreiben werde, ausschließlich auf Varicella zurückzuführen sind, wenn man nicht die Möglichkeit einer sicheren klinischen Differentialdiagnose zwischen Varicella und milden Pocken (Variolois) ausschließen will.

Es sei noch bemerkt, daß die Hornhautreaktion nie von einer Hyperämie der Sclerotica oder der Conjunctiva begleitet ist; wenn dieselbe eintritt, so kann man vermuten, daß man bei der Inkubation irgendein infizierendes Material (Staphylo- oder Streptokokken) eingimpft hat

wie man es tatsächlich in gewissen Fällen aus den Pusteln oder Schorfen der Varicella gewinnt.

Mikrobiologie der Varicella.

Zu meinen bakteriologischen und mikroskopischen Untersuchungen habe ich ein von mehr als 100 Fällen verschiedener Schwere herstammendes und in allen Entwicklungsperioden der Krankheit entnommenes Material angewendet.

Ich habe alle möglichen kulturellen Kunstgriffe benutzt, von der Anwendung hämoglobinhaltiger Kulturböden bis zu Versuchen einer Anreicherung direkt in den kleinen exzidierten Fetzen von varicellöser Epidermis.

Die Resultate waren negativ: Man erhält zuweilen beachtenswerte Befunde, welche jedoch nicht verdienen, hier erwähnt zu werden, weil ihre Beziehungen zur Varicella nicht behauptet werden können.

So habe ich manchmal einen äußerst kleinen Keim (einen der kleinsten, die man kennt) isoliert, welcher an den Zellen des Derma anhaftet, oder in denselben enthalten ist. Auffallend ist, daß man auch bei Scharlach ähnliche Befunde antrifft, wie ich an anderer Stelle wiederholen werde. Dieser Keim ist aber nicht konstant und dabei so ungleichmäßig verteilt, daß es sich nicht lohnt, weiter nach ihm zu fahnden.

Es sei übrigens gleich bemerkt, daß in der Mehrzahl der Fälle der bakteriologische Befund des Serums der Blasen und des Eiters der Pusteln ein negativer war.

Nur in einzelnen Fällen findet man im Eiter Kokken, unter welchen einer in vorwiegendem Maße vertreten ist, welcher kleine Kettchen bildet, auf den gewöhnlichen Nährböden sich gut entwickelt und sich auch in einigen seltenen Fällen für Meerschweinchen pathogen erweist.

Natürlich handelt es sich dabei nur um Begleiterscheinungen. Wie gesagt, geht aus der mikroskopischen Untersuchung nichts Wesentliches hervor: Auch wenn man das Derma abschabt und die verschiedensten Färbungsmethoden anwendet, kann man keine bemerkenswerten Tatsachen nachweisen, wenn man von folgendem absieht:

In zahlreichen Fällen habe ich eine außerordentlich große Menge von kleinen roten, von einem kleinen hellen Hofe umgebenen Körnchen beobachtet, welche in den großen Uninukleierten (bei Färbung nach Giemsa) und in einigen Fällen auch in den Zellen des Dermis sichtbar sind.

Sie haben ein klares, wohldefiniertes Aussehen. Was ihre Zahl anbelangt, so findet man in gewissen Fällen 8–10 in einem und demselben Uninukleierten, während sie in anderen Fällen sehr spärlich sind; stellenweise vereinigen sie sich in Form von äußerst kleinen Diplokokken.

Es würde sich lohnen, mich etwas mehr bei diesem Befund aufzuhalten, wenn ich nicht der Ansicht wäre, daß es sich dabei um die Granulationen von Michaelis-Wolff handelt, obwohl in einzelnen Fällen das Gesamtbild der von mir beobachteten Körper vielleicht wegen der Häufigkeit und Deutlichkeit der Körnchen, welche bei der Varicella genau kreisförmig erscheinen, etwas von demjenigen der bekannten und soeben erwähnten Granula abweiche.

Was ihre reelle Bedeutung anbetrifft, so hoffe ich, mich damit in einer späteren Arbeit über die Granulationen beschäftigen zu können, welche bei den exanthematischen Krankheiten in den Leukocyten erscheinen.

Das Endergebnis der bakteriologischen Untersuchung ist also, daß bei der Varicella kein konstanter und interessanter Befund nachweisbar ist.

Die Hämokultur wurde in 5 Fällen, aber ohne Resultat ausgeführt.

Die Untersuchung mit dem Paraboloid hat nichts ergeben, wenigstens in bezug auf das Serum der Blasen, auf welches ich in besonderem Maße meine Aufmerksamkeit lenkte.

Der einzige Befund, welcher eine besondere Beachtung verdient, ist derjenige, welchen die Schnitte der Hornhaut von mit varicellösem Material geimpfter Kaninchen darbieten.

Ich habe bereits angeführt, daß die Reaktion makroskopisch immer gering ist, was auch durch die mikroskopische Beobachtung bestätigt wird: Stellenweise findet man bei der histologischen Untersuchung nur Spuren einer Infiltration.

Bei der Anfertigung der Präparate ging ich, wie folgt, vor: Ich löste die Hornhaut vom Auge ab oder enukleierte das ganze Auge und spülte es dann mit physiologischer Kochsalzlösung ab. Auf diese zweite Weise kann man die Hornhaut gut ausgebreitet resp. gespannt erhalten, ohne zu dem Kunstgriffe Zuflucht nehmen zu müssen, welcher darin besteht, daß man den Augapfel in einer äquatorialen Ebene bindet, um die Hornhaut besser zu spannen.

Die Stücke wurden in gesättigter Sublimatlösung oder in einer Mischung von Sublimat-Säure-Alkohol oder in Alkohol fixiert. Die beiden ersten Flüssigkeiten sind empfehlenswerter als Alkohol. Die zu untersuchenden Schnitte müssen sehr dünn sein, nicht über 7–8 μ dick. Zur Färbung dient sehr gut Hämatoxylin (ich verwendete Chloralhämatoxylin) und Eisenhämatoxylin. Ich habe auch versucht, Giemsa's Flüssigkeit anzuwenden, aber in diesem Falle erschien das Bild der Körperchen, welche ich nachstehend beschreiben werde, undeutlich, daß bei diesen Untersuchungen letztere Färbemethode nicht zu empfehlen ist.

Bei einer sorgfältigen Untersuchung der Hornhäute kann man folgendes beobachten: In den Zellen des Hornhautepithels, oder, genauer gesagt, in den tiefer liegenden Zellen beobachtet man gewöhnlich in der Nähe des Kernes oder in dem Raume zwischen Kern und Zellenbasis feine, rundliche Körnchen, umgeben von einem hellen Hofe, in Form einer achromatischen Zone. Diese Körperchen sind sehr deutlich sichtbar und hier und da zerstreut; in einigen Fällen findet man lange Strecken der Hornhaut, in welchen die tiefer liegenden Hornhautepithelzellen diese rundlichen Körperchen aufweisen, so daß letztere den Eindruck hervorrufen können, als ob es sich um Basalkörperchen handle. Durch eine vergleichende Untersuchung, resp. einen Vergleich mit normalen Hornhäuten wird aber die Möglichkeit einer Verwechslung in diesem Sinne ausgeschlossen. Die von mir beobachteten Körnchen stellen keinen normalen Befund dar.

In einigen Fällen findet man auch hier und da 2–3 Körnchen in einer und derselben Zelle (siehe Tafel) in verschiedener Weise vereinigt oder angeordnet.

Wenn man die Evolution der kleinen Hornhautwunde abwartet, verschwinden zu einer gewissen Zeit diese Körperchen. Das ist jedoch auch bei mit Varicella inokulierten Hornhäuten der Fall, welche fast keine makroskopisch sichtbare Reaktion aufwiesen.

In den mit Eisenhämatoxylin gefärbten Präparaten kann man beobachten, daß die Körperchen nie so deutlich gefärbt und sichtbar sind, wie es bei den Cytoryctes der Vaccine der Fall ist.

In einigen Schnitten sind die Körnchen äußerst klein, viel kleiner als diejenigen, welche in der hier beiliegenden Tafel dargestellt sind. Auf den ersten Blick könnte man auch meinen, daß es sich um Cytoryctes im Anfang der Entwicklung handle, aber die Körperchen bleiben stets viel kleiner, als die Cytoryctes. Außerdem scheint mir die Färbbarkeit der letzteren mit Hämatoxylin und ebenso mit Eisenhämatoxylin viel stärker, als diejenige meiner Körperchen zu sein. Dazu kommt noch, daß die Cytoryctes viel deutlicher umschrieben sind.

Bemerkenswert ist, daß sie auch an Stellen erscheinen, wo die Reaktion des Gewebes eine negative ist, und daß sie nie dem Kern sehr nahe liegen, sondern zwischen dem Kern und der Aufpflanzungsbasis der Epithelialzellen sichtbar sind.

Welche Bedeutung haben nun diese Körperchen? Eine parasitäre Deutung derselben kann man a priori ausschließen (es ist überflüssig, hier alle die Betrachtungen zu wiederholen, welche man bei der Diskussion über Cytoryctes gemacht hat). Es handelt sich somit darum, zu entscheiden, ob diese Körperchen in einer indirekten Beziehung zum spezifischen Virus stehen, oder ob sie als degenerative Erscheinungen (Karyorhexis, Karyolysis, hyaline Entartung), oder endlich als leukocytäre Reste zu betrachten sind.

Um diese Fragen zu lösen, habe ich meine Präparate mit solchen verglichen, welche ich aus vorher durch Osmiumsäure, oder durch bakterizide Toxine oder Staphylokokken gereizten Hornhäuten angefertigt hatte, und habe des weiteren Präparate von Bandini¹⁾ verglichen, welche er bei Gelegenheit von Untersuchungen über die Cytoryctes nach verschiedenartiger Reizung der Hornhäute bereitet hatte.

Es scheint mir jedoch, daß die auf diese Weise erhaltenen Bilder nicht den meinigen entsprechen; bei diesen ist die Kleinheit der Körperchen charakteristisch und außerdem die geringere Färbbarkeit derselben im Vergleich zu den eingeschlossenen Körperchen, welche man nach Anwendung dieser Reizmittel beobachtet. Daß es sich um eingeschlossene leukocytäre Fragmente handelt, kann man bei der geringen oder ganz fehlenden Infiltration ausschließen. Wahrscheinlicher erscheint es, daß es sich um degenerative, und höchstwahrscheinlich um karyorhektische oder karyolytische Erscheinungen handelt. Die hyalinen Entartungen zeigen andere Färbbarkeitscharaktere, und erscheinen auch bei Anwendung von Hämatoxylin und von Eisenhämatoxylin brillanter gefärbt.

Nichtsdestoweniger ist dieser Befund bemerkenswert, sowohl wegen der Beziehungen, welche er ohne Zweifel mit demjenigen der Vaccinepustel in der Kaninchenhornhaut aufweist, als auch wegen seines spezifischen Charakters.

Er scheint auf entfernte Beziehungen der Homologie zwischen Vaccine und Varicella hinzuweisen, obwohl man die von mir beobachteten Körperchen, wie bereits hervorgehoben wurde, nach meiner Meinung nicht mit Guarnieris Cytoryctes verwechseln kann.

Gegen ihre Spezifität könnte man einwenden, daß sie nicht konstant und sogar verhältnismäßig selten sind. Diese Seltenheit hat in mir die Vermutung erweckt, daß gewisse Fälle von Varicella als Fälle von sehr leichter Variola anzusprechen seien, und daß infolgedessen der von mir beschriebene morphologische Befund als derjenige von Cyto-

1) Rivista d'Igiene. 1906.

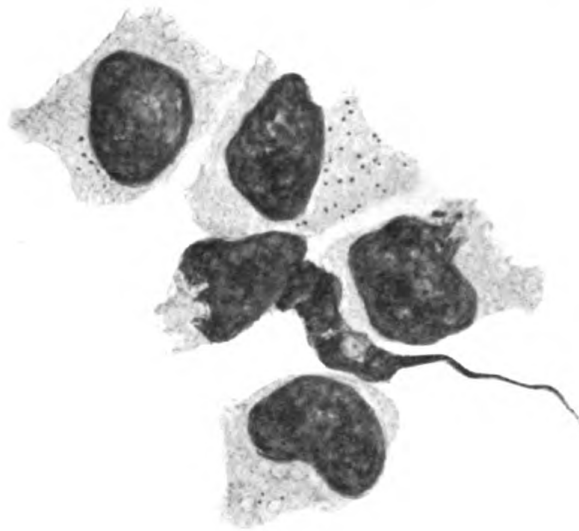


Fig. 1.

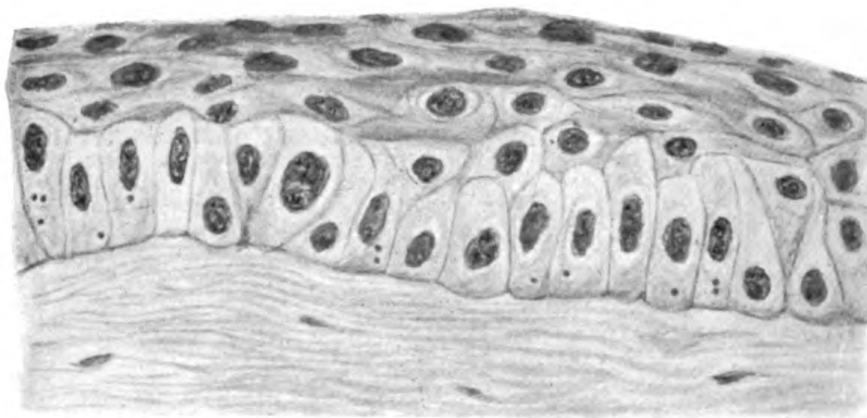


Fig. 2.



Fig. 3.

Verlag von Gustav Fischer in Jena.

ryctes im Anfangsstadium zu betrachten sei, welche nicht dazu gelangen, sich weiterzuentwickeln.

Schon der Umstand allein, daß an diesen eventuellen Einwand gedacht worden ist, beweist jedoch, daß alle klinischen und epidemiologischen Tatsachen sorgfältig untersucht und geprüft worden sind. Deshalb besteht entweder kein tatsächlicher Unterschied zwischen Varicella und Variola, und in diesem Falle sind meine Körperchen als initiale Cytoryctes zu betrachten, oder die klinische, epidemiologische und ätiologische Verschiedenheit der beiden Krankheiten ist eine reelle, wie ich annehme und als durch viele Gründe bewiesen betrachte, und in diesem Falle handelt es sich um einen neuen Befund, welcher von weitem an denjenigen vaccinierten Hornhäute erinnert, von welchem er jedoch differenzierbar ist.

Erklärung der Abbildungen.

Fig. 1. Abgeschabtes Derma in einer varicellösen Blase. (Körnchen von Wolff-Michaelis?) Färbung nach Giemsa.

Fig. 2. Kaninchenhornhaut nach Inokulation von varicellösem Material. (Chloral-Hämatoxylin.)

Fig. 3. Kaninchenhornhaut nach Inokulation von varicellösem Material. (Eisen-Hämatoxylin.)

Apochromat Zeiss, 2 mm 1,30. Komp.-Ok. 8. Rohr 160 cm.

NB. Ich halte einige Präparate für Diejenigen zur Verfügung, welche sich für den Gegenstand interessieren.

Nachdruck verboten.

Recherches sur la spirochétiose des poules de Tunisie et sur son agent de transmission: *Argas persicus* Fischer.

[Institut d'Hygiène expérimentale et de Parasitologie de l'Université de Lausanne.]

Par **Bruno Galli-Valerio.**

Avec 8 figures.

La première observation de spirochétiose des oiseaux a été faite en 1890 par Sacharoff¹⁾. Etudiant une septicémie des oies, qui s'observait chaque année dans certaines stations du chemin de fer transcaucasien, cet observateur découvrait dans le sang des oiseaux infectés, la présence d'un spirochète analogue à *Sp. Obermeieri*. Cette affection très grave qui évoluait comme un typhus, avec des températures de 42,5—43° C, était transmissible par inoculation sous-cutanée d'oie à oie (4—5 j. d'incubation). De deux poulets inoculés, un seul présentait des spirochètes dans le sang et guérissait. Pigeons et moineaux étaient réfractaires. Sacharoff donna à son spirochète la dénomination de *Sp. anserina*. Le matériel fourni par Sacharoff, permettait à Gabritschewsky²⁾ de compléter l'étude de cette intéressante maladie. Il rapportait que Sacharoff avait pu inoculer positivement le canard, qui présentait pourtant une affection plus bénigne que l'oie; établissait la non-inoculabilité du singe, de la souris blanche,

1) Ann. de l'Inst. Pasteur. 1891. p. 564.

2) Centralbl. f. Bakt. etc. Bd. XXIII. 1898. p. 365.

du cobaye, du lapin, du chien, du mulet, du cheval, de la grenouille; la non-transmissibilité de *Sp. Obermeieri* à l'oie et de *Sp. anserina* à l'homme. Cantacuzène¹⁾, expérimentant à son tour avec du matériel fourni par Gabritschewsky, constatait la grande sensibilité des poussins pour *Sp. anserina*.

C'est seulement en 1903, que la spirochétiose de Sacharoff était de nouveau observée: Ducloux et Nicolle²⁾ la trouvaient chez des oies des environs de Tunis et confirmaient sa transmissibilité au canard.

Au courant de la même année, Marchoux et Salimbeni³⁾ observaient à Rio Janeiro une grave épizootie des poules, caractérisée par une température de 42—43°, inappétance, diarrhée, somnolence, pâleur de la crête, plumes hérissées. Ils trouvaient dans le sang un spirochète inoculable aux poules et surtout aux poussins, à l'oie, au canard, à la pintade, à la tourterelle, au moineau; non inoculable au pigeon, cobaye et singe. La transmission était opérée par un *Argas* qu'on reconnut plus tard être *Argas miniatus* C. L. Koch syn. ou simple variété d'*A. persicus* Fischer. Avec des *Argas* infectés, Marchoux et Salimbeni pouvaient infecter même le pigeon et des argas brésiliens, envoyés à Paris, y donnaient la spirochétiose aux poules⁴⁾.

Levaditi⁵⁾, travaillant avec du matériel fourni par Marchoux et Salimbeni, arrivait à cultiver le spirochète brésilien sur agar glycosé et sur sérum de poule chauffé à 77°, contenus dans des sacs de collodium et placés dans la cavité abdominale du lapin. Après 9 passages, les spirochètes gardaient leur virulence. Levaditi⁶⁾ inoculait positivement ce spirochète à l'alouette et au calfat (*Padda oryzivora*) mais non à la pintade, et constatait que les poussins provenant de mères infectées étaient réfractaires à l'infection avec les spirochètes⁷⁾. Avec Lange⁸⁾, Levaditi inoculait positivement le lapin, introduisant dans l'abdomen 10—20 c. c. de sang riche en spirochètes, et en employant des lapins encore à la mamelle, la transmission le lapin à lapin était possible.

Le spirochète brésilien, a reçu le nom de *Sp. Marchouxi* Nuttall (1904) et de *Sp. gallinarum* Blanchard (1905). La première dénomination ayant la priorité, doit être adoptée.

De nombreuses recherches expérimentales ont été pratiquées avec ce spirochète, et sur quelques unes d'entre elles je reviendrai ensuite. Il me suffira pour le moment de citer celles de Fülleborn et Mayer⁹⁾ démontrant la possibilité de transmettre *Sp. Marchouxi* avec *Ornithodoros moubata* Murray et de Schellack¹⁰⁾ avec *Argas reflexus* Fabricius.

Plusieurs foyers de spirochétiose des poules étaient petit à petit signalés: En 1907 Balfour¹¹⁾ signalait la présence de la spirochétiose

1) Ann. de l'Inst. Pasteur. 1899. p. 529.

2) Revue vét. 1903. p. 695. Arch. de l'Inst. Pasteur de Tunis. 1906. p. 39.

3) Ann. de l'Inst. Pasteur. 1903. p. 569.

4) Borrel et Marchoux, Compt. rend. soc. de biol. 1905. 25 fév. Revue vét. 1905. p. 255.

5) Sem. méd. 1906. p. 177.

6) Ann. de l'Inst. Pasteur. 1904. p. 129.

7) Ann. de l'Inst. Pasteur. 1906. p. 924.

8) Compt. rend. de la soc. de biol. 1905. p. 58.

9) Arch. f. Schiffs- u. Tropenhyg. Bd. XII. 1908. Cités par Schellack.

10) Centralbl. f. Bakt. etc. Abt. I. Orig. Bd. XLVI. 1908. p. 486.

11) Brit. med. Journ. 1907. p. 744. Cité dans Journ. of trop. med. 1907. p. 153.

des poules au Soudan égyptien et la considérait déterminée par *Sp. Marchouxi* et transmise par *Argas persicus*. En même temps Balfour observait que des poules de Kartoum, présentant les symptômes de la spirochétiose¹⁾, n'avaient point de spirochètes dans leur sang mais dans leurs globules rouges on observait des corpuscules de 1-5 μ , se colorant par le Giemsa et par le Leishman, corpuscules sur la nature desquels (piroplasmes ou produits de dégénérescence?) il n'osait pas se prononcer. Mais plus tard, revenant sur la question²⁾, il se rattachait à l'opinion de Sambon³⁾ qui considérait les corpuscules endoglobulaires comme des spirochètes pénétrés dans les globules rouges. Comme déjà v. Prowazek⁴⁾ il avait vu *Sp. Marchouxi* pénétrer dans les hématies. Reaney⁵⁾ observait aux Indes trois cas de spirochétiose des poules, et croyait la maladie transmise par les argas très nombreux dans les poulailers.

Montgomery⁶⁾ confirmait au Béluchistan les observations de Reaney et soupçonnait la transmission de la maladie par *Argas persicus*, sans toutefois en donner la démonstration absolue.

Bevan⁷⁾ attribuait la grande mortalité des poulets de la Rhodesia à une spirochétiose, transmise par *A. persicus*, très répandu dans la contrée.

Gareitschnoff⁸⁾ signalait un cas de spirochétiose des poules en Bulgarie. Williamson⁹⁾ observait à Chypre une épizootie des poules et des canards transmise par *A. reflexus*. Les piqûres de cet argas n'avaient rien déterminé chez une homme.

Au mois de mai de 1908, avec des *Argas persicus* recoltés à Dratamar (Kairouan-Tunisie) par le Dr. Santschi, et qu'il m'avait envoyés à Lausanne, je déterminais dans cette ville une infection à spirochètes chez la poule, démontrant ainsi: 1^o l'existence de la spirochétiose des poules en Tunisie; 2^o sa transmission certaine par *A. persicus*¹⁰⁾.

Brumpt et Foley¹¹⁾ décrivaient à leur tour une spirochétiose des poules du Sud oranais due à *Sp. Marchouxi* et transmise par *Argas persicus*.

Comte et Bouquet¹²⁾ observaient en Tunisie (oasis de Degache et environs de Tunis) une spirochétiose des poules inoculable au canard

1) Journ. of trop. med. 1907. p. 153.

2) Journ. of trop. med. 1908. p. 37.

3) Journ. of trop. med. 1907. p. 387.

4) Arb. a. d. Kais. Gesundheitsamte. Bd. XXVI. 1907. Heft I. Cité dans Centralbl. f. Bakt. etc. Abt. I. Ref. Bd. XL. 1908. p. 822.

5) Brit. med. Journ. 1907. p. 1118. Cité dans Bull. Pasteur. 1907. p. 715.

6) Journ. of trop. vet. sc. 1908. No. 1. Cité dans Journ. of trop. med. 1908. p. 335 et Bull. Pasteur. 1908. p. 554.

7) Journ. of comp. pathol. 1908. March. Cité dans Journ. of trop. med. 1908. p. 336.

8) Cité dans Bull. Pasteur. 1908. p. 555.

9) Journ. of trop. med. 1908. p. 181. 15 juin.

10) Comm. à la soc. vaud. des scienc. natur. 1908. 8 juillet. Bull. de la soc. vaud. des scienc. natur. Sér. V. Vol. XLIV. 1908. Procès verb. p. 66. Journ. of trop. Med. 1908. p. 239 (la comm. avait été faite au Dir. de ce journal en mai 1908). Centralbl. f. Bakt. etc. Abt. I. Orig. Bd. XLVII. 1908. Heft 4. p. 494 (article daté du 29 mai 1908). La classification d'*Argas persicus*, m'était confirmée par le Prof. Neumann à qui j'avais communiqué le résultat de mes expériences et envoyé des exemplaires le 19 mai (carte du 26 mai 1908).

11) Compt. rend. soc. de biol. 1908. 18 juillet et Rev. vét. 1908. p. 706.

12) Arch. de l'Inst. Pasteur de Tunis. 1908. p. 163. (Octobre.)

et à l'oie, mais non aux chauves-souris. Cette spirochétiose n'était pas due à *Sp. Marchouxii* mais à *Sp. anserina* déjà observé en Tunisie par Ducloux et Nicolle¹⁾. Elle était transmise par *A. persicus*.

Passés ainsi en revue les principaux travaux parus sur les spirochétioses des oiseaux domestiques, surtout au point de vue de la distribution géographique des ces affections, j'exposerai le résultat de mes recherches personnelles. Comme j'ai déjà indiqué dans mes communications préliminaires²⁾, ayant trouvé en 1907 *Argas persicus* dans une maison de Kairouan³⁾, je m'étais demandé s'il ne jouait pas un rôle dans la transmission d'une affection quelconque à spirochètes. J'avais alors prié mon ancien élève, M^r le Dr. Santschi, médecin à Kairouan, de m'envoyer à la première occasion à Lausanne des argas vivants. Le 7 mai 1908 je recevais en effet à Lausanne une petite boîte contenant une quarantaine d'*A. persicus* vivants, recolté par M^r Santschi le 3 mai à Dratamar près de Kairouan, et le 9 mai, je pouvais commencer mes expériences.

Avant d'exposer le résultat de mes recherches, je donnerai quelques indications sur la technique que j'ai suivie pour les pratiquer.

J'ai gardé les argas dans des bocaux en verre remplis à $\frac{3}{4}$ de terre sèche, à la surface de laquelle j'avais placé des morceaux de bois permettant aux parasites de se cacher. Ces bocaux, couverts avec une morceau de gaze, étaient gardés dans un thermostat à 30–32°.

Pour pratiquer les expériences sur les poules, je me suis tout simplement servi d'une gouttière brisée, destinée à la fixation des chiens. Par quatre rubans, fixés respectivement aux pattes et aux ailes, j'attachais ces extrémités contre les parois de la gouttière. La tête était maintenue tendue en avant, passée dans une anse en fil de fer de sonnette électrique, anse formée en fixant l'un des bouts du fil de fer à un bâton placé transversalement dans la gouttière en avant de l'animal, et en passant d'autre bout dans un trou de ce même bâton, de la sorte à pouvoir élargir ou retrécir à volonté l'anse ainsi formée (Fig. 1). Les

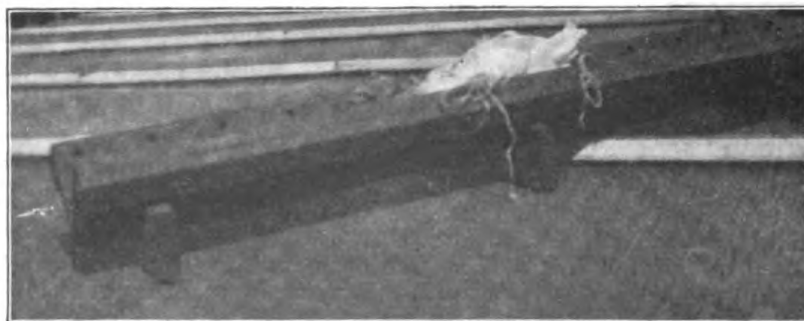


Fig. 1.

poules étaient ainsi très bien fixées, présentant la partie dorsale du corps pour les expériences avec les argas. J'arrachais alors quelques plumes du dos et j'y plaçais les argas en les couvrant avec un verre de montre, que je maintenais fortement appuyé avec le bord sur le

1) Travaux cités.

2) Travaux cités.

3) Bull. de la soc. vaud. des sc. nat. Vol. XLII. 1907. p. 201.

corps de la poule, pour empêcher aux parasites de se cacher sous les plumes.

Exp. I. Jeune poule No. 1. Examen du sang: Point de spirochètes. Température $39-39,5^{\circ}\text{C}$. Piquée par *Argas persicus* le 9 mai 08 (3 exemplaires), le 12 mai (10 exemplaires), le 14 mai (10 exemplaires), le 16 mai (5 exemplaires).

Le 18 mai la poule est triste, elle ne mange pas, présente de la diarrhée. Le 19 elle se tient dans un angle de la cage, la tête enfoncée entre les ailes, les yeux fermées, les plumes hérissées (Fig. 2). Elle a toujours de la diarrhée. La température est de $41,7^{\circ}\text{C}$. L'examen microscopique du sang, montre de nombreux spirochètes. Le 20 mai, même état, température $42,2^{\circ}\text{C}$. Les spirochètes sont plus nombreux dans le sang. Le 21, l'animal est toujours dans le même état. A 3 h. $\frac{1}{2}$ après-midi je lui applique sur le dos une *Hirudo medicinalis* à jeûne depuis une année. Cette sangsue se fixe immédiatement. Après $\frac{1}{4}$ d'h. elle est bien gorgée de sang, et je l'enlève. Dans le sang qui s'écoule par la blessure, il y a une formidable quantité de spirochètes agglomérés dans de gros amas. Le 22 mai, l'animal va beaucoup mieux. La température est de $41,5^{\circ}\text{C}$. Dans le sang on ne trouve plus de spirochètes. La température se maintient entre $41,5-41^{\circ}\text{C}$ jusqu'au 29 mai où la poule est complètement rétablie. Cette poule, piquée de nouveau par 5 *Argas persicus* le 26 juin, n'a rien présenté. Tuée le 15 juillet, la recherche des spirochètes à frais et par coloration, dans le sang et dans les différents organes, a été complètement négative. Négatif aussi a été l'examen des coupes des organes, traitées par le procédé de Volpino-Levaditi.

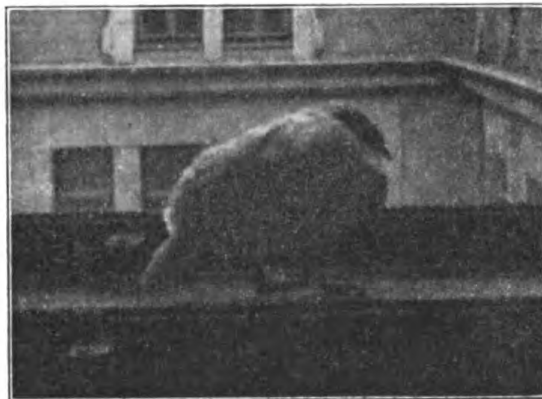


Fig. 2.

Avant d'exposer les autres expériences que j'ai pratiquées, j'indiquerai quels sont les caractères présentés par le spirochète trouvé chez cette poule.

Dans le sang examiné le 19 mai, les spirochètes se présentaient disséminés entre les globules rouges, tout à fait séparés les uns des

1) On sait qu'il est difficile de pouvoir établir exactement la température des oiseaux. J'ai souvent remarqué, surtout chez les petits oiseaux, de fortes et brusques oscillations de la température sous l'influence de la frayeur. Il n'est peut être pas inutile d'indiquer ici, pour les recherches qui pourront être faites sur les infections des oiseaux, quelques températures trouvées par moi et par d'autres chez différentes espèces (voir mon, *Manuale di patologia comparata*. Milano 1898. p. 287). Poule: $39-39,4-42^{\circ}$. Pigeon: $42,5-42,8^{\circ}$. Dinde: $42,7^{\circ}$. Oie: 41° . Canard: $42,9^{\circ}$. Eider: $42,4^{\circ}$. Cigogne: 41° . Héron: 41° . Perroquet: $41,1^{\circ}$. *Athene noctua*: $41,2^{\circ}$. *Accipiter nisus*: 42° . *Spizta cucullata*: $42,1^{\circ}$. *Passer italiae*: 42° . *Fringilla coelebs*: $42,9-43,7^{\circ}$. *Ligurinus chloris*: $42,3^{\circ}$. *Chrysomitris spinus*: $41,5^{\circ}$. *Cannabina linota*: $41,6^{\circ}$. *Emberiza citrinella*: 41° . *Motacilla alba*: 41° . *Calobates melanope*: $40,2^{\circ}$. *Saxicola oenanthe*: $42,1^{\circ}$. *Merula nigra*: $42,8^{\circ}$. *Ruticilla phoenicurus*: $41,2^{\circ}$. *Pratincola rubicola*: $41,5^{\circ}$. *Sylvia curruca*: $42,1^{\circ}$. Corbeau: $42,8^{\circ}$.

autres (Fig. 3). Ils apparaissaient plutôt réfringents, à extrémités effilées, à ondulations plutôt larges analogues à celles de *Sp. Obermeieri* et n'ayant rien à faire avec celles de *Treponema pallidum*. Ces

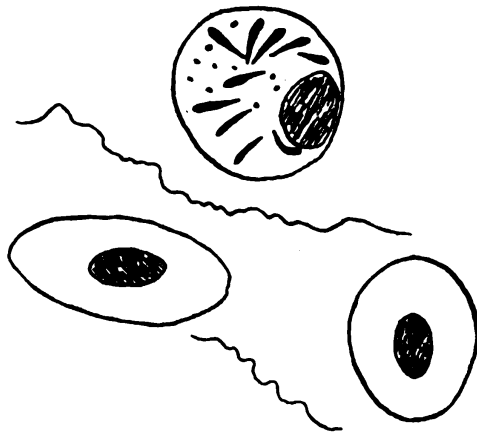


Fig. 3. Oc. comp. 18. ob. imm. hom.
2 mill. Tube 170 mill. Ch. claire.

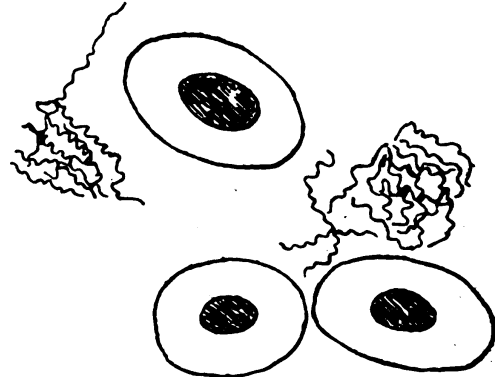


Fig. 5. Comme en Fig. 3.

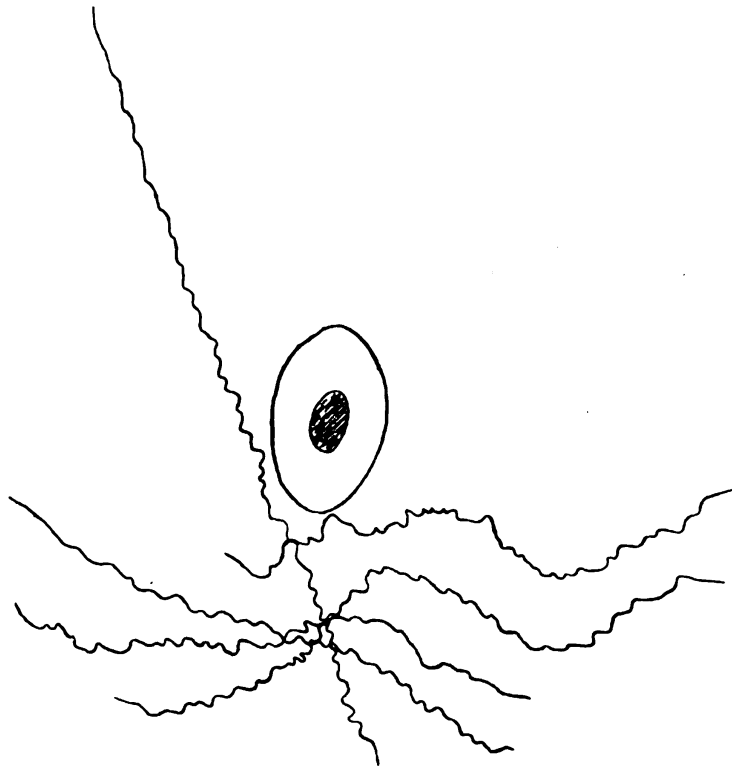


Fig. 4. Comme la Fig. 3, mais dessin très approximatif fait sur une préparation fraîche, à spirochètes vivants.

ondulations étaient en nombre variable de 10 à 20—25. Les dimensions de 10—13—20 μ . Les déplacements étaient très rapides, et ils s'accomplissaient par des mouvements de torsion et même en pas de vis. Observés sous le microscope, ils ont présenté des mouvements pendant 4 heures. Le 20 mai les spirochètes n'étaient plus isolés, mais aggro-

mérés en petits amas immobilisés sur place, amas d'où sortaient les extrémités des spirochètes présentant de rapides mouvements de vibration (Fig. 4). Le 21 mai, dans le sang sorti de la blessure faite par *Hirudo medicinalis*, tous les spirochètes apparaissaient agglutinés dans des amas énormes en forme de pelotons et immobiles (Fig. 5).

Des essais de culture en bouillon et dans du sérum de sang de cheval, n'ont donné aucun résultat.

Les préparations de sang séchées sur porte-objet et fixées avec alcool et éther à parties égales ou avec l'alcool méthylique, permettaient une bonne coloration des spirochètes soit avec la fuchsine phéniquée diluée (1 goutte d'eau et 1 goutte de fuchsine), soit avec le Leishman (5 minutes), soit avec le Giemsa (dilué 1:10) en 16 heures. Les plus jolies préparations étaient celles au Leishman. Avec des mélanges de couleurs préparés par M^r le Prof. Pelet, j'ai pu aussi obtenir des préparations assez bonnes en employant: a) un mélange de bleu de méthylène et de fuchsine; b) un mélange de bleu de méthylène et d'éosine, les deux dilués avec de l'eau distillée et agissant pendant 20'. Les résultats ont été au contraire nuls avec des mélanges de: fuchsine et vert lumière, bleu de méthylène et jaune naphthol, fuchsine et bleu alcalins, vert de malachite et congo R, violet cristallisé et écarlate crocéine, bleu de méthyle et ponceau cristallisé.

Deux essais de coloration des cils par le procédé de Van Ermengem n'ont point donné de résultat.

Exp. II. Poule neuve No. 2. Point de spirochètes. Température 39,7° C. Je porte sur cette poule, le 29 mai, *Hirudo medicinalis* ayant absorbé le sang de la poule No. 1 la 21 mai. Elle se fixe immédiatement et reste fixée $\frac{1}{4}$ d'h. se détachant toute seule, complètement gorgée de sang. La poule n'a rien présentée. La sangsue meurt le 4 juin. Ni à l'examen du sang contenu dans son appareil digestif, ni dans le raclage de la muqueuse buccale, ni sur les coupes traitées par la méthode de Volpino-Levaditi, il n'a été possible de trouver des spirochètes. L'inoculation du sang pris sur cette sangsue, dans la veine de l'aile de la poule No. 3 et du pigeon No. 4 ne provoque aucun trouble morbide.

Exp. III. Avec du sang à spirochètes de la poule No. 1, inoculé le lapin No. 5 dans la veine de l'oreille et le rat blanc No. 6 sous la peau de la cuisse ($\frac{1}{2}$ c.c.), le 19 mai. Aucun trouble appréciable. Les préparations du sang faites le 23 mai et colorées au Leishman, ne montrent rien chez le lapin. Chez le rat blanc, au contraire, plusieurs globules rouges, colorés en rose, présentent des corpuscules de 2—5 μ , arrondis, piriformes, ovoïdes, clairs ou légèrement colorés en azur avec

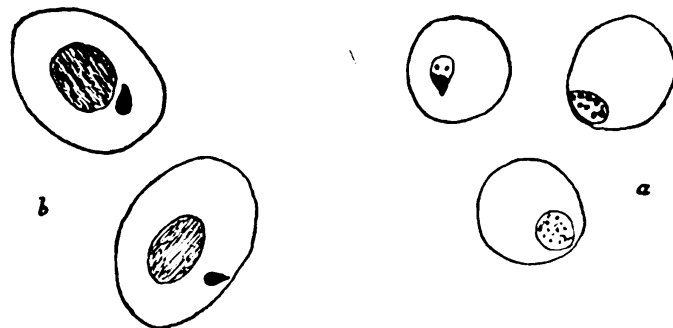


Fig. 6. Comme en Fig. 3.

des granulations fortement colorées en violacé (Fig. 6a). Quelques uns de ces corpuscules sont libres dans le plasma. Point de spirochètes. Le 26 mai les corpuscules sont plus rares, et il n'y en a plus le 29. Le rat, qui était triste et mangeait peu, succombe la nuit du 30 au 31 mai. Il ne présente qu'une légère tuméfaction de la rate. Recherches microscopiques négatives, même sur les coupes traitées par la méthode de Volpino-Levaditi.

Exp. IV. La poule No. 2 de l'expérience II est piquée par 2 *A. persicus* le 11 juin. L'examen du sang pratiqué le 20 est négatif. La poule devient triste, ne mange pas, présente parèze des pattes, reste accroupie et meurt la nuit du 7 au 8 juillet. A l'autopsie on ne trouve qu'un épaississement du péricarde qui adhère au cœur. Dans le sang coloré par le Leishman, on trouve par-ci par-là des globules rouges avec des corpuscules piriformes colorés en violet (Fig. 6b). Les coupes des organes, traitées par la méthode de Volpino-Levaditi, ne montrent point de spirochètes.

Exp. V. Poule neuve No. 7. Point de spirochètes. Température 39,6—39,7° C. Piquée par 5 *A. persicus* le 21 mai. Elle présente des températures de 42,2—42,3° C mais point de spirochètes dans le sang. Elle est piquée de nouveau et 1^{er} juin par un, et le 11 par un autre argas, sans rien présenter. Le 7 juillet elle est piquée par 5 argas. Le 17 la poule est triste, refuse de manger. Parèze des pattes. Température 42° C. Rien dans le sang. Elle succombe le 4 août. Elle ne présente rien ni à l'autopsie ni à l'examen microscopique du sang, sauf une forte leucocytose. La leucocytose a été signalée par Neufeld et v. Prowazek¹⁾ dans la spirochétiase des poules. Point de spirochètes dans les coupes des organes, traitées par la méthode Volpino-Levaditi.

Exp. VI. Poule neuve No. 8. Point de spirochètes. Température 39,6° C. Cette poule est piquée par *A. persicus* de Tunisie qui ont séjourné à l'étuve à 30° C pendant l'été, et précisément: le 13 octobre par un, le 24 par un, le 11 novembre par un, le 27 novembre par un. Elle ne présente rien. Le 7 décembre 4 argas sont écrasés dans de la solution physiologique et quelques gouttes du liquide ainsi obtenu sont inoculées dans la veine de l'aile de la poule. Aucun résultat. Le 14 décembre la poule est piquée par un argas et le 16 décembre par 5 larves écloses d'œufs pondus au laboratoire. Résultat nul. La poule est morte le 31 janvier 09, après avoir été inoculée avec un autre virus. Point de spirochètes.

Examinons un peu en détail et discutons ces expériences.

La première expérience démontre qu'il existe à Kairouan (Tunisie) une spirochétiase des poules transmise sans aucun doute par *Argas persicus*, car avec des exemplaires de cette espèce provenant de cet endroit, j'ai déterminé la spirochétiase de la poule à Lausanne, où cette maladie n'existe pas. Comme Sacharoff²⁾ l'a le premier bien indiqué, quand la maladie est à son plus haut degré, les spirochètes ont la tendance à se grouper en pelotons, pelotons d'où l'on voit sortir des spirochètes en forme de rayons présentant des mouvements vibratoires. Mais dans mon expérience, j'ai noté une véritable agglomération et

1) Arb. a. d. Kais. Gesundheitsamte. Bd. XXV. 1907. Heft 2. Cité dans Centralbl. f. Bakt. etc. Abt. I. Ref. Bd. XLI. 1908. p. 756.

2) Travail cité p. 565.

immobilisation des spirochètes, dans le sang sorti de la blessure faite à la poule par *H. medicinalis*. Je ne puis pas dire si ce phénomène a été provoqué par la sécrétion buccale de la sangsue où s'il aurait eu lieu quand même, dans l'évolution normale de la maladie. C'est en tout cas une exagération du phénomène d'agglomération signalé par les différents observateurs dans la spirochétiose des oiseaux. Comme j'ai indiqué, après l'action de la sangsue, les conditions de la poule se sont rapidement améliorées et l'animal a guéri. Dans cette guérison, la sangsue a-t-elle joué un rôle favorable ou nul? Nous savons que la spirochétiose des poules est souvent caractérisée par une guérison brusque, par crise, sans qu'il y ait une intervention médicamenteuse quelconque. Pourtant dans l'exp. I, tenant compte de l'état grave dans lequel la poule se trouvait, tenant compte du fait que les poules 2 et 7 des exp. IV et V semblent avoir succombé à une forme légère, chronique, je ne suis pas loin d'admettre un certain rôle utile joué par la sangsue. En effet les spirochètes sortis par la blessure, étaient en quantité formidable, et l'organisme de la poule a pu mieux agir sur ceux qui restaient.

La transmission de la spirochétiose avec la sangsue infectée et avec le sang contenu dans son appareil digestif inoculé dans les veines d'une poule et d'un pigeon, n'a pas réussi (Exp. II). L'expérience pourtant mériterait d'être répétée. On sait que v. Prowazek¹⁾ s'est demandé, si *Sp. Schaudinni*, trouvé dans l'*Ulcus tropicum*, ne pourrait pas être transmis par les sangsues.

L'exp. III montre que l'inoculation du sang de la poule infectée, n'a rien déterminé chez un lapin. Mais chez un rat blanc, qui a du reste succombé après quelque temps, j'ai trouvé dans les globules rouges des corpuscules fort analogues à ceux que Balfour a trouvé dans les globules rouges des poules du Soudan et qu'il attribue à des spirochètes pénétrés dans les hématies²⁾. Des corpuscules analogues, je les ai trouvés chez une poule piquée par *A. persicus* et ayant succombé quelque temps après (Exp. IV). Pour mon compte je ne puis pas me prononcer sur la nature de ces corpuscules, d'autant plus que chez une autre poule (Exp. V) ayant aussi succombé après des piqûres d'*A. persicus*, je n'en ai point trouvé. Les poules des exp. V et VI se sont comportées comme certaines poules des expériences de Comte et Bouquet³⁾ qui, piquées par *A. persicus* ont présenté de la fièvre, des paralysies, et ont succombé, sans avoir des spirochètes dans le sang. S'agit-il, comme se demandent ces observateurs, d'une intoxication due au venin de l'argas, ou d'une infection très faible telle que les spirochètes échappent à l'observation? Le fait qu'une poule (Exp. VI), piquée plusieurs fois par des argas n'a point présenté de troubles morbides; qu'un rat blanc non piqué par des argas mais inoculé avec le sang de la poule malade a présenté des corpuscules analogues à ceux observés par Balfour dans les globules rouges des poules du Soudan; que des corpuscules analogues je les ai trouvés chez une poule de l'exp. IV; me portent plutôt à penser qu'il s'agit d'infections faibles à évolution chronique.

Dans l'exp. VI une poule piquée par des exemplaires d'*A. persicus* de Tunisie, gardés au laboratoire pendant 5 mois, n'a rien présenté, soit

1) Arb. a. d. Kais. Gesundheitsamte. Bd. XXVI. 1907. Heft 1. Cité dans Centralbl. f. Bakt. etc. Abt. I. Ref. Bd. XL. 1908. p. 822.

2) Travail cité.

3) Travail cité p. 167.

parce que les argas n'étaient plus infectants, bien que Marchoux et Salimbeni¹⁾ aient constaté que ces parasites sont encore capables de transmettre la spirochétiose, 5 mois après avoir piqué une poule malade, ou bien par le fait que parmi les argas ayant piqué, il n'y en avait pas de porteurs de spirochètes, vu que même en Algérie Brumpt et Foley²⁾ en ont trouvé infectés 1 sur 10. Cette même poule a été aussi piquée sans résultat, par 5 larves écloses au laboratoire d'œufs pondus par une ♀ qui avait servi à l'infection de la poule de l'exp. I. On sait du reste que, jusqu'à maintenant, la transmission de *Sp. Marchouxi* d'*A. persicus* aux œufs et aux larves, n'a pas été démontrée.

Quelle est la forme de spirochétiose que j'ai déterminé chez la poule à Lausanne? Il est très probable qu'il s'agit de la même forme qui a été après décrite dans l'oasis de Degache et à Tunis par Comte et Bouquet³⁾ et qui, suivant ces observateurs, est identique à celle décrite par Ducloux et Nicolle chez les oies de Tunisie⁴⁾ mais non à la forme déterminée par *Sp. Marchouxi*. Mais après avoir lu les différents travaux parus sur les spirochétioses des oiseaux, je me suis convaincu qu'il n'y a, jusqu'à maintenant, qu'une seule spirochétiose des oiseaux, frappant les oiseaux de basse-cour et même plusieurs autres espèces sur lesquelles on a expérimenté: La spirochétiose décrite la première fois en 1890 par Sacharoff. Par conséquent *Sp. anserina* et *Sp. Marchouxi* = *Sp. gallinarum* sont une espèce unique et la dénomination à adopter est celle de *Sp. anserina*, parce qu'elle a la priorité.

Lisons les nombreux travaux parus sur les infections à *Sp. anserina* et à *Sp. Marchouxi*, et nous verrons que les symptômes des deux formes sont absolument identiques. Aucune différence essentielle non plus entre les deux spirochètes au point de vue de leur morphologie et de leur mode de groupement dans le sang. Mühlens⁵⁾ dit aussi qu'il n'y a pas de différence morphologique entre les deux. Y a-t-il une différence au point de vue de l'action pathogène? Nous pouvons affirmer que non. En effet déjà Sacharoff, avec *Sp. anserina* avait pu infecter une poule et les canards, et Cantacuzène démontrait la grande réceptivité des poussins pour ce spirochète. Marchoux et Salimbeni à leur tour, travaillant avec *Sp. Marchouxi*, démontraient la plus grande réceptivité des poussins en comparaison de celle des poules et infectaient en même temps oie, canard, pintade, tourterelle, moineau et tandis que l'inoculation du sang était négative sur le pigeon, cet animal était infecté par la piqure des argas. Levaditi ajoutait aux espèces infectables par *Sp. Marchouxi* l'alouette et *Padda oryzivora* et même le lapin si inoculé avec de fortes doses, mais il n'arrivait pas à infecter la pintade. Williamson à Chypre constatait l'infection des poules et des canards, et Comte et Bouquet infectaient, avec le spirochète de Tunisie, poules, canards et oies. Dans l'action pathogène de l'agent de la spirochétiose des oiseaux, il semble que le virus s'adapte sur une espèce devenant plus virulent pour celle-ci et moins pour les

1) Travail cité.

2) Travail cité.

3) Travail cité.

4) Travail cité.

5) Zeitschr. f. Hyg. Bd. LVII. 1907. p. 405.

autres. Marchoux en effet ¹⁾ a constaté que si on a passé pendant un certain temps sur le pigeon *Sp. Marchouxi*, il perd son action pathogène pour les poules et même si passé rapidement par une série de poussins, il perd son pouvoir infectant pour les adultes.

Le fait constaté par Comte et Bouquet, que le virus brésilien aurait immunisé les poules contre lui-même et non contre le virus tunisien et que celui-ci n'immunise pas contre lui-même ni contre le virus brésilien n'est pas suffisant pour une distinction, d'autant plus que dans un cas un poulet inoculé positivement de virus brésilien, n'a pu être infecté de virus tunisien que 2 mois après l'infection brésilienne. Il est aussi très important de noter que dans une zone très voisine de la Tunisie, l'Algérie, Brumpt et Foley ont trouvé que la spirochétiose des poules est identique à celle du Brésil. Enfin l'agent de transmission, bien établi pour la spirochétiose des poules est *Argas persicus*, si nous faisons exception pour Chypre où il est remplacé par *A. reflexus*. Or il est très probable que la spirochétiose des oies de Sacharoff est aussi transmise par *A. persicus*, très fréquent dans la zone où l'affection a été observée. Nous pouvons donc considérer la spirochétiose des oiseaux, comme transmise dans les conditions ordinaires presque exclusivement par *A. persicus*.

Pour toutes ces raisons, je suis convaincu qu'il n'y a, jusqu'à maintenant, qu'une seule spirochétiose des oiseaux et elle est déterminée par *Sp. anserina* dont *Sp. Marchouxi* = *Sp. gallinarum* n'est qu'un synonyme.

La spirochétiose que j'ai signalé dans les environs de Kairouan, semble avoir fait en 1908 des ravages dans certaines parties de la Tunisie. En effet M^r le Dr. Santschi, en m'écrivant en date du 7 novembre 08 au sujet de ma communication préliminaire, dit: «Je puis vous dire que la spirillose des poules est très fréquente à Kairouan, Dratamar et Pichon. Les indigènes connaissent cette maladie qui leur cause beaucoup de pertes. J'ai vu à Pichon une ferme complètement envahie par les argas. La mortalité des poules était très grande et le poulailler était à côté de la maison. Les habitants, des maltais, ont eu plusieurs fois des accès de fièvre qui ne cédaient pas à la quinine, avec éruptions et démangeaisons. Je me demande si c'est peut être la piqure des argas qu'il faut incriminer.» Quant à *A. persicus* il a été trouvé non seulement par moi, mais aussi par M^r Santschi dans les fentes des murs des environs de Kairouan outre que dans les poulaillers. Je ne veux pas finir cette première partie de mon travail, sans toucher la question de la nature des spirochètes. On sait que la constatation de cils sur les côtés de quelques spirochètes, constatation faite par Borrel ²⁾ et par Zettnow ³⁾, a fait placer de nouveau, par quelques observateurs, ces parasites parmi les bactéries. Je n'entrerai pas dans la discussion de la question au point de vue de la morphologie, de la résistance des spirochètes à certaines substances etc. mais je m'arrêterai à un point de leur biologie: leur transmission par la piqure des arthropodes. Nous savons que dans leur passage chez les arthropodes, ils y subissent une multiplication et dans certains cas (*Sp. Duttoni*) ils passent à l'œuf et aux jeunes larves. Or si des faits analogues

1) *Compt. rend. soc. de biol.* 1907. 12 oct. *Journ. of trop. med.* 1908. p. 58.

2) *Compt. rend. de la soc. de biol.* 1906. 20 jan. *Rev. vét.* 1906. p. 317.

3) *Zeitschr. f. Hyg.* Bd. LII. 1906. p. 539.

s'observent pour des protozoaires tels que les trypanosomes, les piroplasmes et les hémospories, rien de semblable a été jusqu'à maintenant signalé pour les bactéries, dont la transmission par piqûres d'arthropodes n'est qu'un fait accidentel. La transmission de la peste bubonique par *P. cheopis* n'est qu'une dissémination de *B. pestis* par les matières excrémentielles de cette puce. Il me semble que la biologie des spirochètes doit avoir une grande influence pour leur classification dans les protozoaires.

Au courant de mes recherches sur la spirochétiase des poules, j'ai eu l'occasion de faire plusieurs observations sur la biologie d'*A. persicus* et j'en donnerai ici un résumé comme contribution à l'étude d'un parasite si important.

Argas persicus refuse de piquer, s'il n'est pas gardé pendant un certain temps à une température entre 25—30—32° C. Il n'est pourtant pas nécessaire d'expérimenter dans une chambre aux températures indiquées, mais il suffit, de placer les argas pendant 20—30' au thermostat. Quand ils sont décidés à piquer, les argas se fixent tout de suite, de jour comme de nuit. S'ils commencent à changer de place, en général ils ne se fixent pas, même si on les laisse longtemps sur la poule. Ils choisissent vite la place à piquer, enfoncent rapidement leur rostre soulevant légèrement l'extrémité postérieure et restent immobiles. En général, ils se gorgent complètement de sang à la même place, mais parfois ils se fixent successivement à deux endroits. Les argas qui se fixent, sont presque toujours des argas complètement aplatis, mais parfois des argas qui sont encore en partie repus, se fixent quand même. Des argas en mue, trainant encore l'enveloppe, se fixent très souvent, comme les autres. La durée de fixation est variable: Elle dépend souvent du point où l'argas s'est fixé. S'il trouve immédiatement un vaisseau, il se gorge et se détache très vite. J'ai constaté des durées de fixation de 10—15—20—30'—1 h., 1 h. 15', 1 h. 1/2, en moyenne 20—25'. Même chicanés, ils ne se détachent pas jusqu'à ce que leur surface dorsale est rouge et fortement bombée. Alors ils commencent à bouger les pattes et se détachent. Pour repiquer, il y a des exemplaires qui refusent de le faire avant un mois de la première piqûre, d'autres qui repiquent après quelques jours. J'en ai gardé vivants 3 et 4 mois sans prendre de sang, mais la plus grande nombre est mort dans cet intervalle de temps. Quelques pesées que j'ai fait d'exemplaires avant et après avoir piqué la poule, m'ont donné les résultats suivants:

Poids avant	Poids après	Durée de fixation
0,4 cg	4,1 cg	20'
1,2 "	3,5 "	30'
1,2 "	4,5 "	1 h. 30'
2 "	9 "	1 h.
1 "	4,7 "	45'

On sait que Brumpt¹⁾, expérimentant avec *O. moubata*, aurait constaté que des exemplaires de grandes dimensions, peuvent se gorger de près de 50 cg de sang.

La piqûre d'*A. persicus* semble être parfois douloureuse, parfois non. En effet tandis que les poules piquées par plusieurs argas à la fois, ne réagissent pas du tout, d'autres fois à la suite de la piqûre d'un seul exemplaire, s'agitent vivement et crient. Ayant appliqué un

1) Arch. de parasitol. Vol. IV. 1901. p. 580.

exemplaire sur mon avant bras, je n'ai éprouvé qu'une très légère piqure. Il est resté comme lésion, une petite aréole rouge à point central plus sombre, accompagnée de démangeaisons légères pendant quelques jours. Je m'empresse de noter que je réagis très peu aux piqures des arthropodes.

A. persicus secrète en piquant, une substance qui empêche la coagulation du sang. Les blessures en effet laissent toujours couler un peu de sang. J'ai coupé l'extrémité antérieure d'un argas, je l'ai écrasée dans un petit mortier avec quelques gouttes de solution physiologique et je l'ai ajoutée à 2—3 gouttes de sang de poule. Il n'y a pas eu de coagulation¹⁾. Mon expérience confirme les recherches de Nuttall²⁾ sur l'existence chez cette espèce d'une anticoaguline. Mais cette substance est secrétée en petite quantité à la fois, ou bien seulement quand l'argas pratique la piqure, car ayant piqué légèrement la peau d'une poule



Fig. 7.



Fig. 8.

avec une épingle, de la sorte à faire sourdre une toute petite gouttelette de sang, un argas placé en contact avec ce sang a eu tout de suite son extrémité antérieure prise dans un petit coagulum. Les argas qui ont piqués, replacés dans les bocal, se cachent sous les morceaux de bois. Jamais je les ai vus s'enfoncer dans la terre. Par rapport à la ponte d'*Argas persicus*, voici ce que j'ai noté. Une ♀ gardée à 30° C sans manger depuis le mois de Juillet 1908, se gorge de sang sur une poule le 11 novembre. Le 27 novembre je la trouve immobile à la surface de la terre du bocal. Elle est fortement aplatie. Son extrémité antérieure plonge dans une ponte d'œufs en forme de triangle à base tournée vers la ♀, d'une longueur de 16 mm sur 1—2—2½ mm de large. Les œufs sont sphériques, jaunes, translucides, de 5—6 mm

1) Un résultat analogue je l'ai obtenu employant un argas desséché, mort depuis 1 mois. Il a retardé la coagulation de ¾ heures.

2) Ticks. Part I. Argasidae. p. 88. Cambridge 1908.

de diamètre environ (Fig. 7). La ♀, même touchée, ne bouge pas. On la dirait morte. Le 30 novembre la ♀ quitte les œufs pour se cacher sous les morceaux de bois. Les œufs sont environ 50. Le 5 décembre les œufs ont éclos. Les petites larves se tiennent immobiles les unes sur les autres. Elles sont sphériques, d'une coloration café au lait clair avec des petits points plus clairs, du diamètre de 1 mm, à pattes longues et grêles (Fig. 8). Le 12 décembre elles sont toutes disséminées dans le bocal où elles se déplacent avec une vitesse extraordinaire. Elles grimpent même contre les parois. Elles pourraient très bien en sortir à travers la gaze qui le couvre, et à cette période, pour éviter la dissémination des argas dans les laboratoires, il faut garder les bocaux dans une assiette qui contient, par exemple, de l'huile de vaseline.

Le 16 décembre je porte 5 de ces larves sur une poule (Exp. VI). Elles se fixent immédiatement mais elles succombent quelques jours après, peut être à cause de la température de 19–20° C à laquelle la poule est gardée. Celles qui n'ont pas mangé, gardées à 30° C, succombent le 30 décembre.

Est-il possible d'empêcher *A. persicus* de piquer les poules? J'ai fait très peu d'essais à cet égard. Sur une surface déplumée d'une poule je touchais différents points avec une baguette en verre trempée dans des Aethrols: Les argas ne piquaient pas les parties touchées avec ces essences, mais ils se fixaient très bien dans le voisinage. Il me semble donc difficile de trouver des substances capables de protéger les oiseaux contre les piqûres de ces parasites. Je me demande s'il ne serait pas possible de protéger au contraire des oiseaux gardés dans des cages, en plaçant celles-ci dans des plateaux contenant une couche d'huile de vaseline ou d'une autre huile. Un argas, accidentellement tombée dans de l'huile de vaseline, est mort quelques instants après.

Je terminerai ce travail en indiquant un procédé qui m'a permis de garder des exemplaires d'*Argas persicus* pour collection, avec les caractères d'argas encore frais. Je les ai traités par le procédé proposé par Nastoukoff¹⁾ pour la conservation de pièces anatomiques c. a. d. je les ai immergés 24 h. dans un mélange de créosote de hêtre 2 g, Azotate de potasse 10 g, glycérine 200 g, eau 800 g. et passés après dans de l'huile de paraffine. Pour avoir des préparations faciles à démontrer sous le microscope, j'ai monté ces argas par un procédé que j'ai préconisé pour les préparations microscopiques des moustiques²⁾, c. a. d. que j'ai fixé avec du baume du Canada un anneau en verre sur un porte-objet, j'ai rempli l'espace limité par l'anneau d'huile de paraffine, et après y avoir plongé l'argas, j'ai couvert avec un couvre-objet rond fixé aux bords de l'anneau avec du baume du Canada. Examiné au microscope, *A. persicus* ainsi conservé, garde tous ses caractères de structure et sa coloration.

Lausanne, 1^{er} février 1909.

1) Sem. méd. 1908. p 393.

2) Bull. de la soc. vaud. des sciences nat. Vol. XXXVII. 1901. p. 581.

Nachdruck verboten.

Erwiderung auf „Zur Frage der Eier von *Culex cantans*. Antwort etc. von B. Galli-Valerio und J. Rochaz de Jongh“.

Von Dr. Adolf Eysell, Kassel.

In Bd. XLVIII des Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. p. 91 u. 92 führen Galli-Valerio und Rochaz de Jongh gegen meine in Bd. XLVI desselben Blattes p. 717—719 gemachten Bemerkungen über Stechmückeneier die bezüglichlichen Ansichten von Theobald, Giles, Blanchard und Howard ins Feld.

Von diesen Autoren haben zunächst die beiden letzten auszuscheiden. Blanchard gibt auf p. 98 u. 99 seiner „Moustiques“ (1905) eine Beschreibung der Eier von *Culex pipiens* nach der bekannten klassischen Darstellung von Réaumur, diesen Schriftsteller teilweise wörtlich zitierend; Blanchard hütet sich weislich, die bei dieser Art gemachten Beobachtungen zu generalisieren. Gleich vorsichtig verfährt Howard (Notes on the Mosquitoes of the United States. p. 22 u. 23. Washington 1900): er erklärt ausdrücklich, nur die Lebensgeschichte von *Culex* pungenz geben zu wollen, einer Art, von der wir heute wissen, daß sie mit *Culex fatigans* und deshalb auch mit *Culex pipiens* identisch ist.

Weniger gewissenhaft sind Theobald in „A monograph of the Culicidae etc. Vol. I. p. 19. London 1901“ und Giles in seinem „Handbook of the gnats or Mosquitoes. 2. ed. p. 123—125. London 1902“ vorgegangen — und sind deshalb ebenso wie viele andere vor und nach ihnen, als sie, sorglos auf die Autorität des „Vaters der Dipterologie“ bauend, dessen Worte über die ersten Stände der Gattung *Culex* direkt oder indirekt abschrieben, die Opfer der Kritiklosigkeit Meigens geworden. Der sagt nämlich in seiner „Systematischen Beschreibung der bekannten europäischen zweiflügeligen Insekten (1818)“, die Biologie der Gattung *Culex* abhandelnd, auf p. 3 des I. Bandes: „Die Larven leben im Wasser, vorzüglich im stehenden. Das Weibchen legt nämlich mehr als 300 Eier in einem nachenförmigen Klumpen auf die Oberfläche desselben.“

Wenn er nun hinzugefügt hätte, „so wenigstens beschreiben Réaumur, de Geer, Geoffroy und Kleemann den Vorgang der Eierablage bei *Culex pipiens*, und ich nehme deshalb an, daß auch bei den übrigen *Culex*-Arten die eierlegenden Weibchen in derselben Weise verfahren“, dann wäre gegen seine Worte nichts einzuwenden. Das tut er aber nicht — und läßt die Reihe der von ihm beschriebenen Arten unglücklicherweise gleich mit dem portugiesischen *Culex calopus* beginnen, der Stechmücke, die heute meist *Stegomyia calopus* Meigen oder *Stegomyia fasciata* Fabricius genannt wird, und gerade von diesem *Culex* ist es allgemein bekannt, daß er seine Eier nicht in nachenförmigen Klumpen, sondern einzeln ablegt.

Galli-Valerio und Rochaz de Jongh fahren dann fort: „Eysell (Mense, Handbuch der Tropenkrankheiten. Bd. II. 1905. p. 62) sagt selber, daß die Eier der Culicinen in kähnenförmigen schwimmenden Haufen oder einzeln abgesetzt werden.“

Was in aller Welt wollen die Verff. mit diesen meinen Worten beweisen gegen die in meinen Bemerkungen zu den „Beobachtungen über

das Eierlegen der Culiciden von Galli-Valerio und Rochaz de Jongh“ p. 717—719 des XLVI. Bandes dieses Centralbl. mitgeteilten Tatsachen. Das dort und noch mehr das in meinen „Beiträgen zur Biologie der Stechmücken“ (Arch. f. Schiffs- u. Tropenhyg. Bd. IX. 1907. p. 197 u. 198) Vorgebrachte — ein Separatum des Aufsatzes wurde von mir am 20. März 1907 Herrn Prof. Galli-Valerio übersandt — mußte sie gerade zur Vorsicht mahnen, da es ihnen sagte, daß sehr viele *Culex*-Arten keine Eierschiffchen bauen.

Trotzdem erklärten Galli-Valerio und Rochaz de Jongh in Bd. XLVI. dieses Centralbl. p. 133: „Wir konnten feststellen, daß die Eier dieser Art gar nicht mit den gewöhnlichen Eiern der Culicinae übereinstimmen — das Cantans-Weibchen legt voneinander getrennte Eier“, und in Bd. XLVIII. p. 91: „Es scheint also doch, und es ist dies hauptsächlich in unseren Gegenden, wo wir unsere Beobachtungen ausführten, der Fall, daß das Absetzen der Eier am häufigsten kahnförmig geschieht.“

Gegen diese Sätze habe ich nur einzuwenden, daß uns Annahmen und Vermutungen nicht um eines Haares Breite vorwärts bringen; unser Wissen und unsere Erkenntnis werden einzig und allein durch Tatsachen gefördert — und diese bringen Galli-Valerio und Rochaz de Jongh nicht. Vielleicht sind die Verff. aber doch in der Lage, dies zu tun, und bitte ich sie deshalb, mir auch nur eine mitteleuropäische Culicine zu nennen, die außer den im Imaginalzustande überwinterten beiden Arten *Pipiens* und *Annulatus* Eierkähnen baut¹⁾.

Wenn die Verff. dann weiter daran erinnern, daß sie in ihrem „Manuel pour la lutte contre les moustiques. Lausanne 1906“ p. 20. sagten: „daß außer der Gattung *Stegomyia* auch andere Culicinen-Gattungen (*Megarhinus*, *Mansonia* etc.) die Eier einzeln absetzen“, so erlaube ich mir, sie darauf aufmerksam zu machen, daß Mega-

1) Während der Drucklegung meiner Erwiderung erschien im Centralbl. f. Bakt. etc. Abt. I. Orig. Bd. XLIX. Heft 4. p. 553—558 ein weiterer Artikel „Beobachtungen über Culiciden“ von B. Galli-Valerio und J. Rochaz de Jongh.

In demselben berichten die Verff. auf p. 556: „Was uns anbetrifft, so haben wir immer konstatiert, daß *C. nemorosus* seine Eier in Kähnen absetzt, absolut wie *C. pipiens* und *annulatus*, aber die Kähnen sind kleiner, und, wenigstens bei den in 1500 m Höhe gefundenen Exemplaren, ist ihre schwarze Farbe sammetartiger.“

Ich muß annehmen, daß Galli-Valerio und Rochaz de Jongh sich getäuscht haben. Sie erzählen l. c. auf p. 553 ja auch selbst: „Welke Blätter, die nahe dieser Pflanze eingesammelt worden waren, und an welchen ein Ei klebte, gaben, in Wasser gestellt, eine Larve von *Culex*, die sich verpuppte und ein ♂ von *Culex nemorosus* entwickelte.“ Wenn nun *Culex nemorosus* Eier-Kähnen baute, wie hätte dann an dem welken Blatte nur ein Ei kleben können? Verff. würden bei diesem Versuche nicht eine, sondern eine ganze Menge Larven bekommen haben.

Bei ihrer Häufigkeit läßt sich ja nun das Verhalten dieser Stechmücke glücklicherweise unschwer ermitteln.

So oft ich *Culex nemorosus* ♀♀ in meinen Aquarien habe Eier ablegen sehen, und es handelt sich um mehrere Dutzend Beobachtungen in verschiedenen Jahren, konnte ich feststellen, daß die Eier dieser Art einzeln abgesetzt wurden. (*Culex nemorosus* bringt im Gegensatz zu den meisten anderen *Culex*-Arten in der Gefangenschaft trotz reichlicher Blutmahrung nur ausnahmsweise seine Eier zur Reife; es empfiehlt sich deshalb, hochgravide Weibchen im Gelände zu fangen und diese dann in die Aquarien einzusetzen.)

Da Stechmückeneier in steriler Glastube auf stark angefeuchteter Watte viele Tage am Leben bleiben und sich, in gewohnte Verhältnisse gebracht, fröhlich entwickeln, bitte ich Galli-Valerio und Rochaz de Jongh, mir in diesem Sommer mehrere der vermeintlichen *Nemorosus*-Kähnen zu übersenden. Die Brut soll getreulich gepflegt und das Zuchtresultat umgehend bekannt gegeben werden.

rhinus sicher, *Mansonia* höchstwahrscheinlich keine Culicine ist.

Galli-Valerio und Rochaz de Jongh fahren dann fort: „Eysell sagt, das Ei von *Culex cantans* gleiche den Eiern aller Culicinen. Wir erlauben uns, mit dieser Behauptung nicht einverstanden zu sein. Das von uns beschriebene Ei — und man muß sich nur durch Besichtigung unserer Zeichnung überzeugen — hat mit den Eiern der kahnförmig legenden Culicinen nichts gemein; diese sind keulenförmig und nicht spindelförmig, wie das von uns beschriebene Ei.“

Nun sagte ich auf p. 718 des XLVI. Bandes dieses Centralbl.: „Aber nicht nur die Unterfamilie der Culicinen, sondern auch die übrigen Unterfamilien (*Aedinen* etc.) der Stechmücken, welche sich aus siphontragenden Larven entwickeln“ — also der Culiciden s. str. — „zeigen das gleiche Verhalten. Sie legen ihre Eier einzeln ab, und diese Eier besitzen fast ausnahmslos Spindelform.“ Und später: Die Eier von „*Culex pipiens* und *Culex annulatus* machen eine Ausnahme“.

Wo bleibt da auch nur der Schein der Berechtigung zu den eben angeführten mit so viel Emphase vorgetragenen Sätzen?

Galli-Valerio und Rochaz de Jongh behaupten dann weiter, ich habe die Exochorionperlen des Culicineneneies „als eine wasserhelle schleimige Masse beschrieben“. Das ist mir gar nicht eingefallen. Ich sagte: „Nicht «Luftkämmerchen» trennen das Chorion vom Exochorion bei den Stechmücken, welche sich aus siphontragenden Larven entwickeln, sondern eine wasserhelle schleimige Masse verbindet lückenlos die beiden chitinenen «Häute».“

Am Schlusse bemerken Galli-Valerio und Rochaz de Jongh dann noch: „Es steht Eysell frei, diese Gattung“ — *Stegomyia* nämlich — „nicht anzunehmen, obgleich er in seiner, im Handbuch der Tropenkrankheiten erschienenen Arbeit nichts davon sagt, und die Gattung angibt, ohne sie weiter zu besprechen, eine Gattung, die in allen Arbeiten über Culiciden und in allen von gelbem Fieber handelnden medizinischen Büchern angenommen und geläufig gebraucht wird.“

Bei einigem guten Willen hätten Galli-Valerio und Rochaz de Jongh sehen müssen, was ich schon damals (1905) von Theobaldschen Gattungen hielt. Als ich die verbreitetsten *Anopheles*-Arten aufzählte, habe ich die Namen der neuen Genera auf den ausdrücklichen Wunsch des Herausgebers der Tropenkrankheiten in Klammern beigefügt. Aus demselben Grunde, und um nicht zur Carrollschen Bezeichnung der Gelbfiebertmücke in Gegensatz zu treten, habe ich widerwillig den Namen *Stegomyia* in der gedachten Arbeit akzeptiert.

Nachdruck verboten.

Eine wichtige bakteriologische Aufgabe.

Von Dr. **Max Münden**, Hamburg.

Ich bin vor kurzem in dieser Zeitschrift (Abt. II. Bd. XXI. No. 10/12) genötigt worden, auf eine hier 1898 veröffentlichte Arbeit zurückzukommen, in welcher ich, wie auch später in meinem „Chthonoblast“ (p. 95/96) die Wahrscheinlichkeit betonte, daß der angeblich pathogene Schizomycet gar nichts weiter mit der Erzeugung des klinischen Krankheitsbildes zu tun hätte, als daß er vielleicht durch die unbekannte Noxe als pathologisch veränderter Elementarorganismus (Chthonoblast) der Zelle erst geschaffen würde. Was seitdem sowohl von bakteriologischer wie biologischer Seite veröffentlicht wurde, stützt diese Wahrscheinlichkeit an allen Ecken, so daß sich die Notwendigkeit einiger wichtiger abschließender Experimente herausstellt, welche ich bisher bei den Autoren vermisste, da ihr Blick gewissermaßen in Richtung auf den vielleicht sehr unschuldigen Schizomyceten hypnotisiert ist und das Problem deshalb übersehen wird. Leider bin ich selbst nicht in der Lage, derartige Versuche anzustellen und muß mich deshalb darauf beschränken, auf das Problem hinzuweisen und es deutlich zu umgrenzen, in der Hoffnung, daß ein Leser seine experimentelle Bearbeitung in die Hand nehmen wird.

Es kann jetzt als sichere Tatsache hingestellt werden, daß das noch so starke Vorhandensein des typischen Schizomyceten im Metazoon kein klinisches Krankheitsbild mit Notwendigkeit bedingt. (Citron für Schweinepest, Centralbl. f. Bakt. etc. Abt. I. Orig. Bd. XLIII. p. 532; Doerr, *ibid.* Bd. XLI. p. 594 ff.; Weil für Hühnercholera, Arch. f. Hygiene. Bd. LII. p. 430; Weil für Schweineseuche und Sobernheim für Milzbrand, ref. von Sauerbeck in Ergebn. d. allg. Pathol. u. pathol. Anat. 1905. Abt. I. p. 985; R. Koch, für Piroplasmen des afrikanischen Küstenfiebers, ref. von P. Kästner, *ibid.* p. 502; O. Busse für Typhus, Münch. med. Wochenschr. 1908. No. 21; dazu die klinischen Erfahrungen gesunder und gesund bleibender menschlicher Träger der verschiedensten sogenannten pathogenen Arten.)

Wohl aber kann sowohl das typische Krankheitsbild durch sicher bakterienfreie Kulturfiltrate und Exsudate befallener Tiere erzielt werden, und diese Filtrate und Exsudate erzeugen sich allein ihre Antikörper. Der Inhalt derselben, der vielleicht schon unter dem Ultramikroskop sichtbar gemacht werden könnte, zeigt also eine hochgradige biologische Selbständigkeit hinsichtlich Erregung des Krankheitsbildes, eigener Vermehrung und Hervorbringens von Schutzstoffen im befallenen Organismus. Nun entstehen die experimentell zu prüfenden Fragen:

1) Ist die biologische Selbständigkeit der in den Filtraten und Exsudaten vorhandenen Noxe so groß, daß man mit ihr wiederholte Tierpassagen machen kann? Geht die Verstärkung oder Schwächung ihrer klinischen Schädlichkeit dabei parallel dem, was bisher bei derartigen Tierpassagen mit Kulturbakterien bekannt geworden ist? Die Bejahung dieser Fragen würde bedeuten, daß die Noxe auch in der sogenannten Reinkultur ein eigenes Dasein führt und nicht erst vom Schizomyceten als exo- oder endocelluläres Gift bereitet wird. Ich vermute dieses, da noch nie die reale Absonderung aus dem Schizomyceten hat nachgewiesen werden können und die bisherige bloße Annahme eines solchen Vor-

zanges eben unter der sehr anfechtbaren Voraussetzung der spezifischen Tätigkeit des angeblich pathogenen Individuums erfolgte und zu den größten Widersprüchen und Streitigkeiten unter den Autoren geführt hat. Außerdem ist der anaphylaktische Körper tatsächlich durch bakterienfreies Serum mit Erfolg zu übertragen (Kraus und Doerr), besitzt also vollständige biologische Selbständigkeit.

2) Ist diese vermutlich biologisch selbständige Noxe als selbständiges Individuum ultramikroskopisch sichtbar zu machen? Verhalten sich diese Ultrachthonoblasten wie die, welche von den Autoren bisher bei denjenigen Erscheinungen beschrieben wurden, die wir makroskopisch als chemischen Prozeß der Fällung, Synthese usw. zu bezeichnen gewöhnt sind¹⁾? Ist diese Noxe auch auf den Kulturböden angeblich pathogener Schizomyceten ultramikroskopisch nachzuweisen?

3) Finden sich im Körper von Tieren, deren spezifische Krankheitserscheinungen ausschließlich durch sicher bakterienfreie Kulturfiltrate oder Exsudate erzeugt wurden, doch die bekannten pathogenen Schizomyceten vor? Das würde bedeuten, daß ihre Entstehung erst die Folge des Krankheitsprozesses ist, worauf ich hier schon vor 10 Jahren auf Grund bakteriologischen Materials hinwies. Diese Ansicht wird jetzt noch durch das inzwischen gefundene histologische Material gestützt, welches deutlich zeigt, wie der die Zelle zusammensetzende Chthonoblast einesteils schon deutlich bakteriologische Form besitzt und andererseits unter Einwirkung der verschiedenartigsten Stoffe aus ultramikroskopischer Kleinheit zur mikroskopischen Größe und Form anerkannter Schizomyceten und Schizophyten heranwächst. Dieser erst als Folge des Krankheitsprozesses entstehende pathogene Schizomycet wäre das Produkt der Einwirkung der ultramikroskopischen Noxe, des primären Krankheitserregers, auf bestimmte Chthonoblasten des befallenen Organismus, genau so, wie uns das ultramikroskopische Bild einer chemischen Einwirkung diese als Assimilation des einwirkenden Stoffes durch die Chthonoblasten des anderen aufgedeckt hat. Die Vermutung in bisher geltender Anschauung, daß die ultramikroskopischen Individuen der Noxe Keime oder Sporen seien, aus welchen sich die pathogenen Bakterien entwickelten, dürfte aus den verschiedensten Erwägungen heraus sich nicht bestätigen.

Als solche durch das ultramikroskopische Virus bedingte Zellprodukte bezeichnete S. Prowazek die bekannten Körper bei Lyssa, Vaccine und Variola, Scharlach, Molluscum contagiosum, Epitheliom, Hühnerpest und Karpfenpocke²⁾. Warum soll ein solches Zellprodukt denn nicht auch die Form eines Vibrio, Bakterium, Spirillum oder eines Coccus haben? Die autochthone Entstehung letzterer Formen in Zellen, haben außer mir schon vor ca. 20 Jahren A. Wigand an infektionsfreien Zellen bei Beobachtung unter dem Mikroskop an zahllosen Arten und jüngst Dunbar bei einer Alge beschrieben. Die Frage, ob dasselbe nicht auch bei den uns bekannten Krankheiten geschieht, ist also eine durchaus berechnete, um so mehr als sie aufs engste mit der Tatsache der pathogenen Selbständigkeit des toxischen Virus zusammenhängt. Ist die Bakterienform aber nur begleitendes Moment des Krankheits-

1) Ich verweise zur Orientierung auf meine Darlegungen im Archiv f. Entwicklungsmechanik der Organismen. Bd. XXVI. 1908. Heft 1: „Noch einige Bemerkungen zur Chthonoblastenfrage“, vorzüglich p. 181—183 und auf die III. Abteilung im „Chthonoblast“.

2) Arch. f. Protistenkunde. Bd. X. 1907. Chlamydozoa I.

bildes, so brauchen wir nicht alle bakteriologischen Fragen auf den Bacillus zu beziehen, was eben den Wirrwarr geschaffen hat, an dem die Bakteriologie jetzt leidet. Die Causa efficiens ist das ultramikroskopische Virus, das wir in Filtraten und Exsudaten bakterienfrei nachweisen könnten, aber auch auf Nährböden antreffen würden, wo es sich eben im biologischen Sinne vermehrt. Es tritt aber auch im befallenen Organismus in die Struktur des Zellchthonoblasten ein, der zum bisher pathogen bezeichneten Bakterium heranwächst, und deshalb finden wir ihn auch dort als bisher sogenanntes Endotoxin, welches je nach der mehr oder minder stärkeren Bindung und Veränderung ja (Heller) oder nicht von der primären Noxe, dem sogenannten Exotoxin, abweicht.

Was von den Toxinen gilt, will ich auch für die begleitenden Erscheinungen der Hämolytine, Agglutinine etc. gesagt haben. Auch diese werden biologische Selbständigkeit besitzen und brauchen durchaus nicht auf die Erscheinungsform des sogenannten pathogenen Schizomyceten bezogen zu werden, der ja, wie nachgewiesen, oft gar nicht pathogen ist, und wenn er es zu sein scheint, solches nur der Begleitung sonst durchaus biologisch selbständiger Wesen irrtümlich verdankt.

Dieser Beweis ist inzwischen für den Bacillus suipestifer von Uhlenhuth und Hübener glänzend geliefert worden, wie ich erst bei der Korrektur aus dem Referat in dieser Zeitschrift über die zweite Tagung der freien Vereinigung für Mikrobiologie ersah. Die Krankheits-symptome werden hier wirklich nur von einem ultramikroskopischen (?) Virus erzeugt, welches vollständige biologische Selbständigkeit durch Generationen hindurch besitzt und in anderer Weise abgetötet werden muß wie der Bacillus. Letzterer und mit ihm auch alle möglichen anderen Bakterien werden bei gesunden und durch keim-freies Virus erkrankten Tieren in allen Teilen des Körpers angetroffen. Der Bacillus ist in der Kultur also nur der Begleiter des Virus, bereitet ihn aber nicht. Daß er von Uhlenhuth und Hübener noch in bisheriger Weise als Fremdling im Organismus angesehen wird, ist den Autoren nicht übel zu nehmen. Vielleicht aber revidieren sie ihre Anschauungen hierin an der Hand ihrer vorstehenden eigenen Erfahrungen gemäß meiner hier schon vor 10 Jahren gemachten Prophezeiung und sind sie diejenigen, die in üblicher Weise wie beim Bac. suipestifer auch bei allen anderen pathogenen Bakterien zeigen, daß diese harmlose Begleiter des Virus sind. Diese Erkenntnis tut, wie gerade der Wirrwarr in den Anschauungen auf der Tagung deutlich zeigt, der Bakteriologie bitter not. Man hätte sie schon vor 10 Jahren erringen können, als potente Autoren den Herausgeber dieser Zeitschrift lieber bestürmten, solch ketzerische Ideen von mir nicht mehr aufzunehmen.

Nachdruck verboten.

Ueber das antigene Vermögen des Typhusbacillus sowohl in künstlicher als auch in natürlicher Kultur.

[Aus dem Hygienischen Institute der Königl. Universität Palermo
(Direktor: Prof. L. Manfredi).]

Experimentelle Untersuchungen.

Von Dr. Vincenzo Ferrara.

Mit 1 Kurve.

Die Modifikationen, denen die Mikroorganismen durch die verschiedenartigsten äußeren Bedingungen unterstehen können, sind stets Gegenstand zahlreicher Untersuchungen gewesen, von denen die ersten auf die Zeit zurückgehen, in der man glaubte, eine Art in die andere verwandeln zu können. Die Arbeit von Rodet (*La variabilité dans les microbes*. Paris 1894) resumiert sehr gut alle Kenntnisse, welche man bis dahin über das Thema hatte, und man kann überhaupt sagen, daß die Studien darauf gerichtet waren, die Unveränderlichkeit der Species zu behaupten oder zu bekämpfen.

Eine ganz andere Absicht verfolgten die späteren Arbeiten, welche, wenn sie auch darauf gerichtet waren, erhebliche Aenderungen der Arten zu bestimmen, doch nachzuweisen suchten, ob diese neuen, durch die Mikroorganismen in dysgenetischen oder eugenetischen Verhältnissen erworbenen Eigenschaften praktisch verwertet werden könnten. Darauf stützen sich alle Modifikationen, welche bei speziellen Bakterien eintreten, wenn man daraus Impfstoffe erhalten will.

Das Thema ist in verschiedenen Zwischenräumen immer wieder unter verschiedenen Gesichtspunkten erforscht worden, und so fand Müller¹⁾, daß der im Immunserum entwickelte Typhusbacillus weniger agglutinierbar wurde. E. W. Ainley Walker²⁾ beobachtete unter Benutzung desselben Kulturbodens, daß die Bakterien nicht nur ihre Agglutinierbarkeit verloren, sondern auch ihre Virulenz und ihre Widerstandsfähigkeit gegen die Antikörper des Immunserums zunahm. Aehnliche Erscheinungen wurden von Hamburger³⁾ und Morello⁴⁾ für den in immer konzentrierteren Immunserumlösungen entwickelten Eberth'schen Bacillus und den *B. pyocyaneus* gefunden. Bail⁵⁾ erklärte diese Erscheinung durch die Annahme, daß die Rezeptorengruppen durch agglutinophore Gruppen ersetzt waren.

Eisenberg⁶⁾ isolierte bei einem Kranken mit Mischinfektion den *B. pyocyaneus* und fand, daß derselbe der agglutinierenden und bakteriolytischen Wirkung des Serums des Kranken selbst, welches ein bedeutendes Agglutinationsvermögen auf den aus künstlichen Kulturen stammenden *B. pyocyaneus* besaß, widerstand. Sacquépée⁷⁾ entnahm aus der Milz eines Typhuskranken den Eberth'schen Bacillus und

1) Münch. med. Wochenschr. 1903.

2) Centralbl. f. Bakt. etc. Abt. I. Orig. Bd. XXXIII. 1902. p. 297.

3) Wien. klin. Wochenschr. 1903.

4) Lavori dell'Istituto d'Igiene di Palermo. 1903.

5) Arch. f. Hyg.

6) Centralbl. f. Bakt. etc. Abt. I. Orig. Bd. XXXIV. 1903. p. 739.

7) Ann. de l'Inst. Pasteur. 1901.

stellte seine Widerstandsfähigkeit gegen das agglutinierende Serum fest, welche mit dem Altern des Bakteriums verschwand. Müller erklärte die Erscheinung durch die Annahme, daß der Mikroorganismus sich im menschlichen Körper gegen die Agglutinine immunisierte.

Die Arbeiten von Charrin und De Nittis¹⁾, Vincent²⁾ Haffkine³⁾, Trommsdorff⁴⁾, Martoglio⁵⁾, Casagrande⁶⁾, Székely⁷⁾, Savtschenko⁸⁾, Danysz⁹⁾, Sacharoff¹⁰⁾, Carapelle¹¹⁾ zeigten im allgemeinen, daß die verschiedenen angewendeten Mikroorganismen je nach ihrer Herkunft, d. h. je nach der Natur des Nährbodens, abweichende biologische Eigenschaften annehmen konnten.

Besondere Erwähnung für das von mir behandelte Thema verdienen die Untersuchungen von Bail und Rubritius¹²⁾, welche den Cholera-vibrio und den Typhusbacillus betreffen. Diese Autoren belegten mit der Bezeichnung tierische Bacillen jene Mikroorganismen, deren Kulturen im Körper der Tiere vorgenommen werden. Unter diesen Bedingungen haben Verff. einerseits Aenderungen morphologischer Natur beobachtet und andererseits konstatiert, daß die erwähnten tierischen Mikroorganismen besser der bakteriolytischen und agglutinierenden Wirkung des Immunserums widerstehen.

Kyuzo Tsuda¹³⁾ hat bemerkt, daß in vitro das Blutserum imstande war, beim Typhusbacillus die nämlichen morphologischen und biologischen Modifikationen hervorzurufen, die derselbe besitzt, wenn er im Tierkörper kultiviert wird. Diese Erscheinung war jedoch in den Hauptzügen von Carapelle beobachtet worden, welcher wahrnahm, daß die von ihm in frischem Serum gezüchteten Bakterien der bakteriolytischen Wirkung des Immunserums entgingen und an Virulenz zunahmen.

In dem Blutsérum findet sich also eine Substanz, welche imstande ist, die Mikroben zu tierischen zu machen. Nach Kyuzo Tsuda wirkt sie auf die lebenden Bacillen, und auf die Erscheinung hat die An- oder Abwesenheit organischer Zellen keinen Einfluß. Der erwähnte Autor erklärt die Widerstandsfähigkeit der tierischen Bacillen gegen die Immunisations- und Agglutinationswirkung des Serums durch die Annahme, daß die Ambozeptoren schwer durch die in Rede stehenden Bacillen fixiert werden.

Ghaessner und Roscules¹⁴⁾ studierten die Modifikationen, welche die verschiedenen künstlichen Kulturböden in den Bakterien zu verursachen imstande waren. Sie sahen dabei, daß *B. proteus*, auf besonderen Nährböden kultiviert, ein mehr oder weniger starkes hämolytisches und antihämolytisches Vermögen erwarb.

Unter Fortführung des Themas habe ich dagegen sehen wollen, welche Unterschiede sich beim Typhusbacillus, je nach seiner Herkunft,

1) Soc. de biol. 1898.

2) Ann. de l'Inst. Pasteur. 1898.

3) Ann. de l'Inst. Pasteur. 1890.

4) Arch. f. Hyg. 1901.

5) Ann. d'Igiene sperim. 1899.

6) Ann. d'Igiene sperim. 1901.

7) Baumgartens Jahresber. 1896.

8) Ann. de l'Inst. Pasteur. 1897.

9) Ann. de l'Inst. Pasteur. 1900.

10) Centralbl. f. Bakt. etc. Abt. I. Orig. Bd. XXXVII. 1904. p. 411.

11) Centralbl. f. Bakt. etc. Abt. I. Orig. Bd. XLVI. 1907. p. 632.

12) Centralbl. f. Bakt. etc. Abt. I. Orig. Bd. XLIII. 1907. p. 641.

13) Centralbl. f. Bakt. etc. Abt. I. Orig. Bd. XLVI. 1908. p. 502.

14) Zeitschr. f. exp. Pathol. 1906.

d. h. aus natürlicher oder künstlicher Kultur, konstatieren ließen. Zum Index dieser möglichen Modifikationen habe ich das antigene Vermögen genommen und es im Serum von geimpften Tieren resp. mit Laboratoriumskulturen und tierischen Kulturen vergleichend studiert.

Technik.

Zwei Partien von 8 Kaninchen vom Gewicht von je 1500 g wurden auf endovenösem Wege geimpft, eine mit durch 1-stündiges Erhitzen auf 60° C abgetöteter Laboratoriumskultur, die zweite mit der Peritonealflüssigkeit eines an Typhusinfektion verendeten Meerschweinchens, die ebenfalls 1 Stunde lang auf 60° C erhitzt worden war.

Damit die der ersten und zweiten Partie eingepflichte Bakterienmenge die gleiche war, stellte ich den Mikrobengehalt einer Normalöse Peritonealflüssigkeit und einer gleichen Oese Agarkultur fest. Nachdem ich so konstatiert hatte, daß der Bakteriengehalt der einen sich zu dem der anderen wie 1:5 verhielt, verwendete ich, dem Rat Friedbergers folgend, bei der Impfung geringste Dosen, und zwar für die Kaninchenpartie mit künstlicher Kultur $\frac{1}{100}$ Oese, für die Partie mit tierischer Kultur $\frac{1}{20}$ Oese.

Nach 9 Tagen, d. h. als die Tiere ihr ursprüngliches Gewicht wieder erlangt hatten, machte ich den Aderlaß und schritt zu dem ersten Versuche, indem ich die Sera auf die Agglutinations- und Immunisations-eigenschaften hin prüfte.

Da ich, wie aus der Tabelle zu ersehen ist, keine befriedigenden Resultate auf dem endovenösen Wege erzielt hatte, injizierte ich stets in der gleichen, oben angegebenen Dosis neue künstliche und tierische Kultur und nahm nach 6 Tagen die respektiven Versuche wieder auf.

Bei diesen Versuchen hielt ich die von Rothberger¹⁾ hervor gehobene Tatsache gegenwärtig, nach der es nicht gleichgültig ist, ob einem Tier reichlich zur Ader gelassen wird, da auf diese Weise die Agglutinine, falls sie nicht gänzlich verschwinden, wenigstens sich doch enorm verringern. Um diesen Uebelstand zu vermeiden, verwendete ich die aus 8 Kaninchen, sämtlich von dem gleichen Gewicht und dem gleichen Geschlecht, bestehende Partie, denen ich wechselweise zur Ader ließ.

Die Erscheinung der Agglutination wurde im hängenden Tropfen beobachtet, um sie in ihren verschiedenen Phasen verfolgen zu können. Von Zeit zu Zeit, und zwar nur zum Zweck der Kontrolle, bediente ich mich auch der makroskopischen Beobachtungen.

Das Immunisationsvermögen wurde durch Einimpfung von $\frac{1}{2}$ ccm Blutserum von resp. mit künstlicher und tierischer Kultur geimpften Tieren in Kaninchen und Meerschweinchen, auf die ich dann in einem Abstand von 1 Stunde eine Einimpfung von 4 tödlichen Mindestdosen von Typhusbouillonkultur folgen ließ, geprüft. In der Tabelle sind auch zwei zu einer dritten Impfung derselben Tiere gehörige Versuche aufgeführt. Diese dritte Impfung wurde zu Kontrollzwecken ausgeführt. Lenkt man seine Aufmerksamkeit auf die nach der zweiten Impfung vollführten Beobachtungen, so fällt das charakteristische Verhalten der Agglutinationserscheinung auf, welche zuerst stärker beim Serum der mit Agarkultur geimpften Kaninchen erschien, als bei dem mit tierischer Kultur geimpften Tiere; darauf erfolgte das Gegenteil.

1) Centralbl. f. Bakt. etc. Abt. I. Orig. Bd. XLI. 1906. p. 469.

Impfungen	Versuche	Nach wieviel Tagen?	Gesamtwicht der immunisierten Kaninchen	Serum der mit Agarkultur geimpften Kaninchen										Erfolg
				Agglutinationsvermögen	bei Kaninchen				Immunisationsvermögen				bei Meerschweinchen	
					Agglutination positiv beim Titer	Ge- wicht	Menge des injizierten Immun- serums	Menge ¹⁾ der injizierten 24-stündigen Typhus- bouillon- kultur	Erfolg	Ge- wicht	Menge des injizierten Immun- serums	Menge der injizierten 24-stündigen Typhus- bouillon- kultur		
1. 1.		1. 9 12 000	Zweifelhafte bei Ver- dünnung $\frac{1}{10}$ Negativ bei stärkeren Verdünnungen	$\frac{1}{2}$ ccm	1100	4 ccm	† nach 20 Std.	505	$\frac{1}{2}$ ccm	2 ccm	† nach 19 Std.			
				$\frac{1}{2}$ "	1120	4 "	† " 12 "	495	$\frac{1}{2}$ "	2 "	† " 17 "			
				$\frac{1}{2}$ "	1115	4 "	† " 48 "	460	$\frac{1}{2}$ "	2 "	überlebte			
				$\frac{1}{2}$ "	1105	4 "	überlebte	490	$\frac{1}{2}$ "	2 "	† nach 36 Std.			
2. 1.		2. 14 12 000	Negativ bei stärkeren Verdünnungen	$\frac{1}{2}$ "	998	3 $\frac{1}{2}$ "	† nach 48 Std.	510	$\frac{1}{2}$ "	2 "	überlebte			
				$\frac{1}{2}$ "	1095	4 "	überlebte	500	$\frac{1}{2}$ "	2 "	"			
				$\frac{1}{2}$ "	980	3 "	† nach 32 Std.	525	$\frac{1}{2}$ "	2 "	† nach 26 Std.			
				$\frac{1}{2}$ "	1200	4 "	† " 48 "	480	$\frac{1}{2}$ "	2 "	† " 33 "			
3. 2.		3. 20 12 000	Zweifelhafte bei Ver- dünnung $\frac{1}{10}$ Negativ bei stärkeren Verdünnungen	$\frac{1}{2}$ "	1120	2 "	† " 25 "	500	$\frac{1}{2}$ "	1 "	† " 20 "			
				$\frac{1}{2}$ "	1090	2 "	† " 24 "	505	$\frac{1}{2}$ "	1 "	† " 26 "			
				$\frac{1}{2}$ "	1095	1 "	† " 22 "	500	1 "	$\frac{1}{2}$ "	† " 20 "			
				$\frac{1}{2}$ "	1100	1 "	† " 18 "	490	1 "	$\frac{1}{2}$ "	† " 23 "			
4. 2.		4. 36 12 000	Zweifelhafte bei Ver- dünnung $\frac{1}{10}$ Negativ bei stärkeren Verdünnungen	—	—	—	—	—	—	—	—			
				—	—	—	—	—	—	—	—			
				$\frac{1}{2}$ ccm	990	3 ccm	† nach 48 Std.	510	$\frac{1}{2}$ ccm	2 ccm	überlebte			
				$\frac{1}{2}$ "	1110	4 "	† " 50 "	540	$\frac{1}{2}$ "	2 "	† nach 60 Std.			
5. 3.		5. 14 12 000	Negativ bei stärkeren Verdünnungen	$\frac{1}{2}$ "	1120	4 "	† " 72 "	490	$\frac{1}{2}$ "	2 "	überlebte			
				$\frac{1}{2}$ "	1090	4 "	† " 72 "	490	$\frac{1}{2}$ "	2 "	überlebte			
				$\frac{1}{2}$ "	990	3 ccm	† nach 48 Std.	510	$\frac{1}{2}$ ccm	2 ccm	überlebte			
				$\frac{1}{2}$ "	1110	4 "	† " 50 "	540	$\frac{1}{2}$ "	2 "	überlebte			

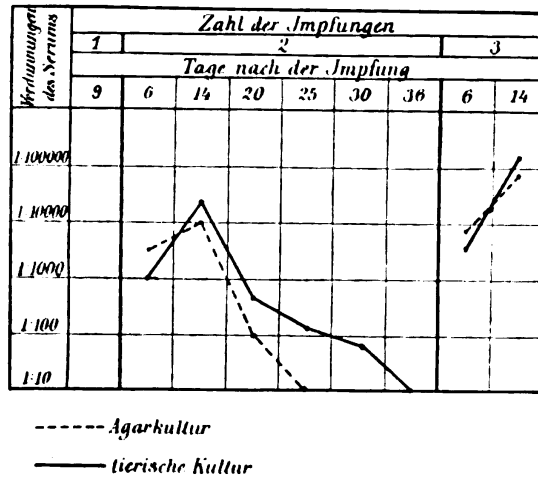
Impfungen	Nach wieviel Tagen?	Gesamtgewicht der immunisierten Kaninchen	Serum der mit tierischer Kultur geimpften Kaninchen		Immunisationsvermögen				bei Meerschweinchen			
			Agglutinationsvermögen	Agglutination positiv beim Titer	Ge- wicht	Menge des injizierten Immunserums	Menge der injizierten 24-stündigen Typhusbouillonkultur	Erfolg	Ge- wicht	Menge des injizierten Immunserums	Menge der injizierten 24-stündigen Typhusbouillonkultur	Erfolg
1.	9	12 000	Zweifelhaft bei Verdünnung $\frac{1}{10}$ Negativ bei stärkeren Verdünnungen	$\frac{1}{1000}$	1095	$\frac{1}{2}$ ccm	4 ccm	† nach 17 Std.	510	$\frac{1}{2}$ ccm	2 ccm	† nach 15 Std.
					1115	$\frac{1}{2}$ "	4 "	† " 15 "	520	$\frac{1}{2}$ "	2 "	† " 13 "
1.	6	12 000	$\frac{1}{40000}$	$\frac{1}{1000}$	1090	$\frac{1}{2}$ "	4 "	überlebte	510	$\frac{1}{2}$ "	2 "	überlebte
					1160	$\frac{1}{2}$ "	4 "	† nach 47 Std.	470	$\frac{1}{2}$ "	2 "	"
2.	14	12 000	$\frac{1}{40000}$	$\frac{1}{1000}$	1100	$\frac{1}{2}$ "	4 "	überlebte	480	$\frac{1}{2}$ "	2 "	"
					1080	$\frac{1}{2}$ "	4 "	"	495	$\frac{1}{2}$ "	2 "	"
3.	20	12 000	$\frac{1}{700}$	$\frac{1}{1000}$	1150	$\frac{1}{2}$ "	4 "	† nach 48 Std.	490	$\frac{1}{2}$ "	2 "	† nach 50 Std.
					1095	$\frac{1}{2}$ "	4 "	überlebte	378	$\frac{1}{2}$ "	2 "	überlebte
4.	25	12 000	$\frac{1}{700}$	$\frac{1}{1000}$	1100	$\frac{1}{2}$ "	2 "	† nach 36 Std.	500	$\frac{1}{2}$ "	1 "	† nach 36 Std.
					1100	$\frac{1}{2}$ "	2 "	† " 28 "	510	$\frac{1}{2}$ "	1 "	überlebte
5.	30	12 000	$\frac{1}{80}$	$\frac{1}{1000}$	1105	$\frac{1}{2}$ "	1 "	überlebte	495	$\frac{1}{2}$ "	$\frac{1}{2}$ "	"
					1100	$\frac{1}{2}$ "	1 "	† nach 50 Std.	510	$\frac{1}{2}$ "	$\frac{1}{2}$ "	"
6.	36	12 000	Zweifelhaft bei Verdünnung $\frac{1}{10}$ Negativ bei stärkeren Verdünnungen	$\frac{1}{300000}$	1080	$\frac{1}{2}$ "	1 "	† " 24 "	360	$\frac{1}{2}$ "	$\frac{1}{2}$ "	† nach 18 Std.
					1100	$\frac{1}{2}$ "	1 "	† " 20 "	520	$\frac{1}{2}$ "	$\frac{1}{2}$ "	† " 23 "
1.	6	12 000	$\frac{1}{60000}$	$\frac{1}{300000}$	1090	$\frac{1}{2}$ "	4 "	überlebte	530	$\frac{1}{2}$ "	2 "	überlebte
					1110	$\frac{1}{2}$ "	4 "	† nach 56 Std.	600	$\frac{1}{2}$ "	$2\frac{1}{2}$ "	† nach 48 Std.
2.	14	12 000	$\frac{1}{300000}$	$\frac{1}{300000}$	1150	$\frac{1}{2}$ "	4 "	überlebte	505	$\frac{1}{2}$ "	3 "	überlebte
					1105	$\frac{1}{2}$ "	4 "	"	500	$\frac{1}{2}$ "	3 "	"

1) Tödliche Mindestlosis für die Kaninchen vom Durchschnittsgewicht von 1100 g 1 ccm; für die Meerschweinchen von 500 g Gewicht $\frac{1}{2}$ ccm.

Die Versuche der dritten Impfung bestätigten vollständig die vorausgehenden, weshalb ich davon abgestanden habe, sie sämtlich aufzuführen. Jedoch mache ich darauf aufmerksam, daß dieses Mal die Immunität und Agglutination nicht nur eine größere Intensität erreicht hatten, sondern auch in dem Serum der Tiere länger anhielten.

Wollte man den Gang der Agglutinationserscheinung graphisch zum Ausdruck bringen, so bekäme man das beigegebene Diagramm:

Verlauf der Agglutination.



Die gleichen Experimente versuchte ich auch bei Meer-schweinchen. Anstatt sie jedoch auf endovenösem Wege zu behandeln, impfte ich sie intraperitoneal, im übrigen der bei den Kaninchen benutzten Technik folgend. In der Tat erzielte ich ein bis zu Verdünnungen von 1:50, 1:80 agglutinierendes Serum, und zwar sowohl bei den mit künstlicher als auch bei den mit tierischer Kultur geimpften Tieren. In bezug auf die Immunität bekam ich unsichere Resultate, die jedoch dahin neigen, ein ausgeprägteres Immunisationsvermögen für das Blutserum der mit tierischer Kultur behandelten Tiere annehmen zu lassen.

Der Schluß, den ich aus meinen Untersuchungen ziehe, ist der, daß die Mikroorganismen, je nach der Herkunft des Kulturbodens, ihre biologischen Eigenschaften auch in bezug auf das antigene Vermögen ändern. Dies wird bestätigt durch die Tatsache, daß

1) Das Immunisationsvermögen des Blutserums der mit tierischer Typhuskultur geimpften Kaninchen erheblicher ist an Intensität und Dauer, als das des Serums der mit künstlicher Kultur (Agarkultur) geimpften Kaninchen.

2) Die tierische Kultur verleiht dem Kaninchenserum ein Agglutinationsvermögen, das zuerst weniger intensiv ist als dasjenige, welches die künstliche Kultur verleiht; dann jedoch erreicht es höhere Werte und nimmt weniger plötzlich ab.

3) Die der Wiederimpfung unterworfenen Tiere reagieren intensiv und das Agglutinationsvermögen nimmt alsdann sofort einen hervortretend hohen Wert an; jedoch nimmt der zuerst beobachtete Unterschied zwischen dem durch die künstliche und die natürliche Kultur hervorgerufenen Agglutinationsvermögen ab.

4) Die Immunität folgt dem Gang der Agglutination, steigt mit dem Steigen dieser und fällt und verschwindet mit dem Fallen und Verschwinden derselben.

Nachdruck verboten.

Ueber die Wirkung des Magen- und Darmsaftes auf Pyocyanase¹⁾.

[Aus dem Laboratorium des Prof. Dr. R. Emmerich im Hygienischen Institut München.]

Von **B. Kulakowsky.**

In der letzten Zeit wurden mehrere Mitteilungen über die erfolgreiche Behandlung einiger Infektionskrankheiten, wie Diphtherie, Angina, Scarlatina mit Pyocyanase gemacht. Es ist von Interesse und praktischer Bedeutung, die Einwirkung des Magen- und Darmsaftes auf die Pyocyanase zu untersuchen und festzustellen, ob die wirksamen Bestandteile derselben eine Beeinträchtigung im Magen und Darm erfahren, weil die Pyocyanase auf einige vom menschlichen Darm aus pathogen oder toxisch wirkende Bakterien tödend und bakteriolysisch einwirkt. Besonders stark ist die bakterizide und bakteriolysische Wirkung auf die Choleravibrionen, wie es schon längst Prof. Emmerich und Löw²⁾ und neuerdings Dr. L. Schapiro³⁾ gezeigt haben. Nach L. Schapiro vermochte 1 ccm Pyocyanase 17500 Millionen Choleravibrionen innerhalb 5 Minuten zu vernichten.

Während die chemischen Darmantiseptica alle Bakterien des Intestinaltrakts, sowohl die schädlichen als auch die nützlichen, wahllos vernichten⁴⁾, hat die Pyocyanase den Vorteil, daß *Bact. coli* keine erhebliche Einbuße der Keimfähigkeit durch dieselbe erleidet⁵⁾.

Zu den Versuchen wurden Choleravibrionen verwendet, welche bei der letzten Choleraepidemie in Tiflis (September 1908) reingezüchtet worden waren. Nur bei Versuch I wurden Milzbrandbacillen benutzt.

Versuche mit Magensaft.

Diese Versuche wurden mit natürlichem menschlichen Magensaft ausgeführt, welcher durch Aushebern 1 Stunde nach dem Probefrühstück gewonnen wurde. Die Verdauungsfähigkeit des Magensaftes wurde durch die Fibrinprobe geprüft und die Azidität durch Titrieren bestimmt. In allen verwendeten Proben von Magensaft wurde das zugesetzte Fibrin in höchstens 2 Stunden bei 37° aufgelöst.

Versuchsanordnung.

Mischungen von 1 ccm Pyocyanase und 1 ccm Magensaft wurden nach 5, 15 und bei Versuch II nach 30 Minuten langer Einwirkung des letzteren bei 37° C mit der vorher genau ermittelten Menge Natronlauge neutralisiert. Eine dritte Probe, welche aus entsprechend gleichen Mengen Pyocyanase und physiologischer Kochsalzlösung bestand, diente zur

1) Die obigen Untersuchungen wurden unter genauer Befolgung der Vorschriften des Kgl. Bayer. Staatsministeriums des Innern (30. Dezember 1904) zum Vollzuge des Reichsgesetzes über die Bekämpfung gemeingefährlicher Krankheiten ausgeführt.

2) Bakteriolysische Enzyme etc. (Zeitschr. f. Hygiene. Bd. XXXI. 1899.)

3) Schapiro, L., Ueber das bakterizide Verhalten der Pyocyanase etc. (Hygien. Rundschau. 1908. No. 8. p. 460.)

4) Moro, E., Natürliche Darminfektion. (Münch. med. Wochenschr. 1906. No. 41.)

5) Schapiro, L., Hyg. Rundschau. 1908. No. 8; Emmerich u. Löw, Zeitschr. f. Hyg. Bd. XXXI.

Kontrolle. Zu jeder Probe wurden 0,2 bzw. 0,3 ccm Choleravibrionen-Suspension in steriler Bouillon zugesetzt, welche 20 Stunden bei 37° auf schrägem Agar gezüchtet worden waren. Nach dem Zusatz der Vibrionenaufschwemmung wurden sofort und nach verschiedenen Zeiträumen, während welchen die Proben im Brutschrank bei 37° C standen, 2 Oesen von jeder Probe auf Gelatine übertragen und Platten gegossen.

Die bakteriolytische Wirkung der Pyocyanase war selbst makroskopisch daran zu erkennen, daß die nach dem Zusatz der Choleravibrionen getrübbte Flüssigkeit meistens schon nach ca. 15–20 Minuten durchsichtig wurde und sich nach einer Stunde völlig klärte.

Die Keimzählung wurde nach 24 Stunden bei 100-facher Vergrößerung vorgenommen und nach 48- und 72-stündiger Aufbewahrung der Platten bei 22° C kontrolliert.

Die folgenden Tabellen geben die Zahl der ausgesäeten Keime in der ganzen Mischung.

Versuch I (Milzbrandbacillen).
Mit Magensaft von 40 Gesamtazidität.

	Zeit der Einwirkung des Magensaftes		Kontrollprobe mit physiologischer Kochsalzlösung
	5 Minuten	1/4 Stunde	
Zahl der Keime sofort nach Zusatz der Milzbrandbacillen	607 500	405 000	675 000
Nach 1/4 Stunde	0	0	0

Versuch II.
Mit Magensaft von 44 Gesamtazidität.

	Zeit der Einwirkung des Magensaftes		Kontrollprobe mit physiologischer Kochsalzlösung
	1/4 Stunde	1/2 Stunde	
Sofort nach Zusatz der Choleravibrionen	256 950 000	623 250 000	569 250 000
Nach 1/4 Stunde	6 750 000	19 687 000	0
Nach 1/2 Stunde	3 452 000	8 100 000	0

Versuch III.
Mit Magensaft von 50 Gesamtazidität.

	Zeit der Einwirkung des Magensaftes		Kontrollprobe mit physiologischer Kochsalzlösung
	5 Minuten	1/4 Stunde	
Sofort nach Zusatz der Choleravibrionen	111 300 000	125 212 000	102 952 000
Nach 1/4 Stunde	35 300	49 600	39 000
Nach 1 Stunde	0	0	0

Versuch IV.
Mit Magensaft von 72 Gesamtazidität.

	Zeit der Einwirkung des Magensaftes		Kontrollprobe mit physiologischer Kochsalzlösung
	5 Minuten	1/4 Stunde	
Sofort nach Zusatz der Choleravibrionen	92 825 000	99 560 000	112 770 000
Nach 1/4 Stunde	12 800	38 000	34 200
Nach 1 Stunde	0	0	0

Versuch V.

Mit künstlichem Magensaft (Pepsin 0,1 gelöst in 100 g Wasser + 1,0 Salzsäure officin.). In diesem Versuch wurden 1,5 ccm Pepsinsalzsäurelösung mit 1 cm Pyocyanase versetzt und so verfahren wie bei den anderen Versuchen.

	Zeit der Einwirkung der Salzsäurepepsinlösung		Kontrollprobe mit physiologischer Kochsalzlösung
	5 Minuten	$\frac{1}{4}$ Stunde	
Zahl der Keime sofort nach Zusatz der Cholera-vibrionen	450 240 000	553 800 000	436 170 000
Nach $\frac{1}{4}$ Stunde	4 623 000	6 130 000	1 680 000
Nach 1 Stunde	0	0	0

Aus diesen Zahlen ergibt sich, daß die Pyocyanase durch den menschlichen Magensaft nur eine unbedeutende Beeinträchtigung ihrer bakteriziden Wirkung erfährt. Bei den meisten Versuchen ist eine solche überhaupt nicht in Erscheinung getreten. In Versuch IV vermochte 1 ccm Pyocyanase 99 560 000 Keime innerhalb einer Stunde ganz zu vernichten, trotz der viertelstündigen Einwirkung des Magensaftes von hohem Säuregehalt. Nur bei sehr großer Aussaat von Cholera-vibrionen im Versuch II, wo die Mischung nur eine halbe Stunde der Einwirkung der Pyocyanase ausgesetzt war, ergab sich insofern eine geringe Abschwächung der bakteriziden Eigenschaften der Pyocyanase, als bei $\frac{1}{4}$ -stündiger Einwirkung des Magensaftes von 256 950 000 ursprünglich ausgesäten Keimen 3 452 500, und nach $\frac{1}{2}$ -stündiger Einwirkung desselben von 623 250 000 Cholera-vibrionen noch 8 100 000 Keime lebend waren, während im Kontrollversuch mit physiologischer Kochsalzlösung die ganze Aussaat von 569 250 000 Cholera-vibrionen schon nach $\frac{1}{4}$ Stunde völlig vernichtet war.

Dagegen im Versuch V mit künstlichem Magensaft, wo die Pyocyanase eine Stunde eingewirkt hat, sind, trotz der großen Aussaat und der größeren Menge des zur Pyocyanase zugesetzten Magensaftes — $1\frac{1}{2}$ ccm zu 1 ccm Pyocyanase — sämtliche Keime — 553 800 000 — in der angegebenen Zeit vernichtet worden.

Um die Wirkung des Darmsaftes auf Pyocyanase zu beurteilen, wurde zunächst ein Vorversuch mit alkalischer 0,05-proz. Trypsinlösung gemacht und sodann mußte ein Tierversuch, durch Einführung der Pyocyanase und Cholera-kultur per os, ausgeführt werden, weil die Gewinnung von tierischem Darmsaft mit großen Schwierigkeiten verbunden ist.

Versuch mit Trypsin.

1 ccm einer Lösung von 0,5 g Trypsin in 100 ccm 0,2-proz. Soda-lösung wurden mit 1 ccm Pyocyanase versetzt und nach 2-stündiger Einwirkung des letzteren bei 37° 0,2 ccm Cholera-vibrionenaufschwemmung in Bouillon hinzugegeben. Zur Kontrolle diente eine Probe mit entsprechend gleichen Mengen physiologischer Kochsalzlösung, Cholera-kultur und Pyocyanase. Plattenverfahren wie bei den Versuchen mit Magensaft.

Zahl der ausgesäten Keime in der ganzen Mischung.

	Trypsinlösung mit Pyocyanase	Physiologische Kochsalz- lösung mit Pyocyanase
Sofort nach Zusatz der Cholerakultur	19 870 000	9 936 000
Nach $\frac{1}{4}$ Stunde	220 800	33 000
Nach 1 Stunde	0	0

Aus dieser Tabelle ist zu ersehen, daß das Trypsin keine schädigende Wirkung auf die Pyocyanase ausübt.

Tierversuche.

I.

Dieser Versuch wurde an 2 Meerschweinchen von ca. 400 g Gewicht in folgender Weise ausgeführt. Jedem der Meerschweinchen wurde mittelst Schlundsonde zuerst 10 ccm 2,5-proz. Natriumbikarbonatlösung¹⁾ eingeführt, um den Mageninhalt alkalisch zu machen und somit eine Schädigung der Choleravibrionen durch die Magensäure zu verhüten. Nach 10 Minuten wurden 10 ccm einer Bouillonsuspension von Choleravibrionen, die 20 Stunden bei 37° auf 3 schrägen Agarproben gezüchtet worden waren, in der gleichen Weise eingeführt.

Nach $\frac{1}{4}$ Stunde erhielt eines der beiden Meerschweinchen wieder mittelst Schlundsonde 10 ccm Pyocyanase. Das andere Tier diente zur Kontrolle.

Nach 2 Stunden wurden die Meerschweinchen getötet und sezziert. Von verschiedenen Darmabschnitten wurden 2 cm lange Stückchen in Gelatine gebracht und Platten gegossen. Zur Kontrolle wurden auch Verdünnungsplatten mit je 3 Oesen gemacht. Die Zählung ist wie bei den Versuchen mit Magensaft vorgenommen worden.

Die mit Inhalt des Dünndarms gegossenen Platten wurden offenbar durch ein tryptisches Ferment des Darmsaftes verflüssigt, aber die Verdünnungsplatten gestatten die vergleichende Beurteilung der Zahlenverhältnisse der Choleravibrionen mit und ohne Pyocyanase.

	Aus dem		
	mittleren Dünndarm	untersten Ab- schnitt des Dünndarms	Dickdarm
Meerschweinchen ohne Pyocyanase	12 100	108 000	68 000
mit Pyocyanase	90	3 600	3 000

1) Daß die Pyocyanase durch die Bikarbonatlösung nicht geschädigt wird, zeigt folgender Versuch: 1 ccm 2,5-proz. Natriumkarbonatlösung wurde mit 1 ccm Pyocyanase versetzt und 1 Stunde bei 37° stehen gelassen. Kontrollröhrchen und Plattenverfahren wie bei Magensaft.

	Pyocyanase mit Natr. Bicarb.	Pyocyanase mit physio- logischer Kochsalzlösung
Zahl der Keime sofort nach Zusatz der Cholerakultur	36 900 000	24 840 000
Nach $\frac{1}{4}$ Stunde	0	0

II.

Der zweite Tierversuch wurde in der gleichen Weise wie der erste ausgeführt, jedoch nur 5 ccm 5-proz. Natriumbikarbonatlösung, 6 ccm Choleravibrionenaufschwemmung und 5 ccm Pyocyanase per os eingeführt.

Zur Plattenaussaat wurden diesmal nur 3 Oesen des Inhalts von jedem Darmabschnitt verwendet.

	Aus dem Inhalt des		
	mittleren Dünndarms	untersten Ab- schnitt des Dünndarms	Dickdarms
Zahl der Keime bei Meer- schweinchen ohne Pyo- cyanase	10 800	378 000	2 356 000
mit Pyocyanase	1 350	26 100	127 500

Aus diesen Versuchen geht hervor, daß die Pyocyanase durch den Darmsaft nicht nachweisbar geschädigt wird und daß dieselbe sehr große Mengen von Choleravibrionen im Darm abzutöten vermag, ohne aber eine vollständige Vernichtung der allerdings in enormen Mengen eingeführten Vibrionen herbeizuführen.

Es muß hier noch folgendes erwähnt werden: Dr. Schapiro¹⁾ hat beobachtet, daß an und für sich nicht tödliche Dosen von Choleravibrionen akut tödlich wirken, wenn sie gleichzeitig mit Pyocyanase einem Meerschweinchen in die Peritonealhöhle injiziert werden. Dieser Effekt könnte möglicherweise durch Endotoxine verursacht worden sein, welche bei der Auflösung der Choleravibrionen durch Pyocyanase frei geworden sind, oder aber es handelt sich um Bakterienproteine. (In vitro konnte das Freiwerden von Toxinen durch Pyocyanase nicht nachgewiesen werden.)

Um nun festzustellen, ob durch die Auflösung von großen Mengen Choleravibrionen durch Pyocyanase im Darmrohr Vergiftungs- oder Krankheitserscheinungen auftreten, wurde folgender Tierversuch ausgeführt:

Ein Meerschweinchen, welches 20 Stunden gehungert hatte, erhielt per os, nachdem der Mageninhalt alkalisch gemacht worden war, den Choleravibrionenbelag von 2 Agarröhrchen, welcher in 5 ccm Bouillon aufgeschwemmt war und gleich darauf 5 ccm Pyocyanase. Das Tier wurde am gleichen und in den folgenden Tagen beobachtet. Es nahm das vorgelegte Futter wie gewöhnlich und es waren weder Vergiftungs- noch Erkrankungserscheinungen zu bemerken. Ob nun bei der Auflösung von Choleravibrionen durch Pyocyanase überhaupt keine Endotoxine frei werden, oder ob die frei gewordenen Toxine durch die Pyocyanase selbst, oder durch Darmenzyme²⁾ entgiftet werden muß, noch genauer untersucht werden.

Aus allen den angeführten Versuchen darf man schließen, daß auch beim Menschen durch wiederholte Verabreichung von Pyocyanase eine bedeutende Verminderung der Choleravibrionen im Darm erzielt werden kann. Eine völlige Keimfreimachung des Darmes ist natürlich nicht möglich und in bezug auf Bact. coli nicht erwünscht. Auch die in

1) Hyg. Rundschau. 1908. No. 8.

2) s. Nenzky und Schoumow-Simanowsky, Die Entgiftung der Toxine durch die Verdauungssäfte. (Centralbl. f. Bakt. Bd. XXIII. 1898.)

dem Gewebe der Darmwände sitzenden Choleravibrionen werden vielleicht von wirksamen Pyocyanasekonzentrationen nicht erreicht werden, jedenfalls ist die beträchtliche Verminderung der Keimzahl der Choleravibrionen durch die Pyocyanase insofern von großer Bedeutung, als entsprechend der Zahl der vernichteten Keime auch die Giftproduktion geringer wird.

Auch die proteolytischen Eigenschaften der Pyocyanase werden durch die Einwirkung des Magensaftes nicht aufgehoben.

1 ccm Pyocyanase Lingner wurde während $\frac{1}{2}$ Stunde der Wirkung des menschlichen Magensaftes (von 50 Ges.-Acid.) ausgesetzt, neutralisiert und auf Chloroformgelatine gebracht. Zur Kontrolle wurden die entsprechenden Mengen Pyocyanase mit physiologischer Kochsalzlösung genommen. Die Mengen der verflüssigten Gelatine (bei 22° C) wurden von Tag zu Tag festgestellt und waren in beiden Proben gleich.

Nachdruck verboten.

Die Pyocyanase.

[Aus dem Institut für Hygiene der Kgl. Universität zu Parma
(Vorstand: Prof. E. Bertarelli).]

Von Dr. Iellio Bocchia.

Ins Deutsche übertragen von Dr. K. Rühl-Turin.

Die Erkenntnis, daß gewisse vom *Bacillus pyocyaneus* herstammende Produkte und besonders die Pyocyanase auf andere Keime eine hemmende und zuweilen sogar eine wirkliche antagonistische Wirkung ausüben, ist keineswegs neu; es genügt, diesbezüglich auf die Untersuchungen hinzuweisen, welche Emmerich und Löw, Tavernari und andere über die Wirkung der Pyocyanase als Antagonist des Milzbrandes und sogar als Vaccinierstoff gegen den hämatischen Milzbrand ausgeführt haben. Nach den Mißerfolgen der Pyocyanase auf diesem Gebiete hat man von diesem Produkte einige Zeit nicht mehr gesprochen.

In den letzten 2 Jahren sind jedoch wieder einige Arbeiten über diesen Gegenstand erschienen. So wurde die Pyocyanase als Desinfektionsmittel für die Nasenlöcher und als prophylaktisches Mittel gegen die Cerebrospinalmeningitis vorgeschlagen. Später wurde ihre Anwendung als nützliches Mittel für lokale Medikationen bei Diphtherie vorgeschlagen, wobei man von der Annahme ausging, daß sie ein bedeutendes bakterizides Vermögen auch gegen den Loefflerschen *Bacillus* besitze.

Die Pyocyanase ist bekanntlich ein im Körper des *Bacillus pyocyaneus* enthaltener Stoff, welcher bei der Zerstörung des *Bacillus* selbst frei wird. Neben der Pyocyanase erzeugt der *Bacillus pyocyaneus* einen für diesen Mikroorganismus charakteristischen Farbstoff, das Pyocyanin, welches von Jordos 1860 isoliert wurde; er bildet außerdem das Fluorescein und besondere Enzyme, und zwar proteolytische, diastatische und invertierende.

Wassermann hat gefunden, daß der *Bacillus pyocyaneus* Toxine bildet, und daß man, wenn man Tieren das Toxin allein einspritzt,

fast ausschließlich Antitoxin erhält, während man durch Einspritzung der Bakterienkörper kein Antitoxin, sondern eine große Menge von bakteriziden Stoffen erhält.

Die Pyocyanase übt eine auflösende Wirkung auf den *Bacillus pyocyaneus* selbst und auf den cellularen Körper einiger anderen Mikroorganismen aus. Wie gesagt wurde, haben einige Autoren seine Wirkung auf den hämatischen Milzbrand, auf den Diphtheriebacillus und auf den Cholerakeim (Blagovetschensky, Löw, Tavernari) untersucht. Rumpf hat einen besonderen Antagonismus zwischen dem *Bacillus pyocyaneus* und dem Eberthschen *Bacillus* hervorgehoben, dagegen scheint Bessou gefunden zu haben, daß der *Bac. pyocyaneus* Kaninchen zur Infektion mit Eberthschen oder mit *Coli*-Bacillen prädisponiert.

In einer vor kurzem in der Münch. med. Wochenschr. erschienenen Arbeit (5. Nov. 1907) empfiehlt Emmerich die Pyocyanase bei der Behandlung der Diphtherie. Nach seinem Vorschlage soll man die Rachenhöhle der Diphtheriekranken örtlich mit Einstäubungen von Pyocyanase behandeln und diese Operation vermitteltst eines Escherichschen Apparates mehrmals täglich wiederholen.

Die Pyocyanase soll nicht nur die Entwicklung der Loefflerschen Bacillen hinhalten und diese letzteren töten und auflösen, sondern nach Emmerich auch die Staphylo- und Streptokokken zerstören. Deshalb soll die Pyocyanase sehr nützlich bei Mischinfektionen sein, gegen welche sich das gewöhnliche antidiphtherische Serum als unwirksam erweist.

Ob hierbei nicht ein theoretisches Vorurteil eine gewisse Rolle spielt, kann man noch nicht feststellen. Aus diesem Grunde habe ich systematische Untersuchungen über die antagonistische und bakterizide Kraft der Pyocyanase angestellt, um festzustellen, bis zu welchem Grade die Hoffnung und das Vertrauen der Autoren gerechtfertigt ist, welche dieser Substanz den Wert und die Würde eines Desinfektionsmittels zugeschrieben haben.

* * *

Um die Pyocyanase zu bereiten, kultiviert man den *Bac. pyocyaneus* in Bouillon im Brütkasten bei 37° C. Auf der Oberfläche der Kulturflüssigkeit bildet sich ein dickes Häutchen, welches, wenn man das Glas schüttelt, bricht, auf den Boden sinkt und langsam gleichsam verdaut wird. Es bildet sich ein neues Häutchen, welches ebenso verdaut werden kann usw. Dabei werden jedoch die nachfolgenden Häutchen immer dünner, bis die Entwicklung des Bacillus und die Bildung von Häutchen aufhört. Nach 4—5 Wochen findet man in der Bouillon keine Bacillen mehr, weil sie verdaut und aufgelöst worden sind. Die Kulturflüssigkeit wird nun mit einer Berkefeldschen Kerze filtriert, und im Filtrat findet man die Pyocyanase.

* * *

Um die Wirkung der Pyocyanase auf die Mikroorganismen zu untersuchen, habe ich alle die Methoden angewendet, welche mir sichere Resultate über das bakterizide, hemmende und antagonistische Vermögen dieses therapeutischen Materials liefern konnten.

1. Fähigkeit der Pyocyanase, die Entwicklung von Kulturen zu hindern.

Ich habe Glasröhrchen, welche 5 ccm steriler Bouillon enthielten, dadurch infiziert, daß ich in jedes 2 Oesen der Bacillenemulsion einführte. Jedem Glasröhrchen habe ich verschiedene Mengen des die Pyocyanase enthaltenden Filtrates und dann so viel sterile Bouillon zugesetzt, bis der Gesamthalt des Glasröhrchens 15 ccm betrug. Die Kulturmittel wurden 5 Tage im Brutschrank gehalten und dann untersucht.

	Pyocyanase ccm									
	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1
Typhus	—	—	+	+	+	+	+	+	+	+
Milzbrand	—	—	—	—	—	—	+	+	+	+
Streptokokken	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Staphylokokken	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Fränkele Diplokokken	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
B. subtilis	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Diphtherie (Glykosebouillon)	—	—	—	—	—	—	—	+	+	+
B. pyocyaneus	—	—	—	—	—	+	+	+	+	+
Cholera (Bouillon nach Dunham-Koch)	—	—	—	—	—	—	—	+	+	+
Tetanus (anaërobe Entwicklung)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Proteus vulgaris	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Kochs Bacillus (Glyzerinbouillon)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Meningokokken	—	—	—	—	+	+	+	+	+	+
Friedländersche Pneumobacillen	—	—	+	+	+	+	+	+	+	+

— = Steriler Nährboden. + = Entwicklung von Keimen.

2. Fähigkeit, bereits entwickelte Kulturen in Bouillon zu zerstören.

Diese Untersuchungen wurden mit Bouillonkulturen (10 ccm in jeder Glasröhre) ausgeführt, welche 8 Tage im Brückasten gelassen worden waren; jeder Kultur wurden 10 ccm Pyocyanase zugesetzt, und die Kulturflüssigkeit wurde während einer Periode von 10 Tagen täglich untersucht.

10 ccm des die Pyocyanase enthaltenden Filtrates haben in 1 Tag die Kultur von Loefflers Bacillen zerstört, in 2 Tagen die Cholera-kultur und die Kultur von hämatischem Milzbrand, in 4 Tagen die Pyocyaneus-Kultur, in 5 Tagen die Meningokokken- und die Typhus-kultur und in 9 Tagen die Pneumobacillenkultur; dagegen waren die Kulturen von Staphylokokken, Diplokokken, Bac. subtilis, Tetanus, Proteus vulgaris, Streptokokken und Kochschen Bacillen nach 10 Tagen noch nicht zerstört.

3. Bakterizide Kraft der Pyocyanase.

Um das bakterizide Vermögen zu untersuchen, habe ich in kleine Reagensgläschen verschiedene Mengen des die Pyocyanase enthaltenden Filtrates getan und durch Zusatz von physiologischer Kochsalzlösung den Gesamthalt des Röhrchens auf 2 ccm gebracht. Diese verschiedenen Flüssigkeiten habe ich dann mit Bacillen von Loeffler infiziert (2 Oesen der Emulsion auf jedes Röhrchen). Nachdem ich dieses Material verschiedene Zeit im Brutschrank gelassen hatte, habe ich aus jedem Röhrchen 1 Oese der Flüssigkeit entnommen und damit Platten auf Glykoseagar angelegt. Nachdem ich diese 4 Tage im Brutschrank bei 37° C gelassen hatte, habe ich die Kolonien gezählt. Zur Kontrolle

habe ich auch Platten mit einer Verpflanzung in sterile Bouillon angefertigt.

	Pyocyanase ccm			
	0,10	0,20	0,50	1,0
Zahl der Kolonien nach 3 Stunden	200	200	180	180
" " " " 6 "	250	200	100	80
" " " " 20 "	300	150	40	—

Platten mit Kultur in steriler Bouillon
nach 3 Stunden 250 Kolonien
" 6 " 450 "
" 20 " 800 "

4. Desinfektionskraft.

Nachdem ich sterile Glaswollbüschchen mit Emulsionen von Bacillen in physiologischer Kochsalzlösung infiziert und vermittelst Schwefelsäure im Trockenkasten getrocknet hatte, habe ich sie in Pyocyanase eingetaucht und darin 2—4 Tage gelassen.

Dann habe ich sie in sterilisiertem Wasser gewaschen, in Glasröhrchen mit steriler Bouillon eingeführt und in den Brutschrank bei 37° C gelegt.

Nach 2—4 Tagen habe ich die Kulturflüssigkeiten untersucht:

	nach 2 Tagen	nach 4 Tagen	nach 2 Tagen	nach 4 Tagen
Milzbrand	steril	steril	Bacillus Koch	Bacillen
Typhus	Bacillen	steril	Bac. pyocyan.	steril
Diphtherie	steril	steril	Staphylokokken	Kokken
Cholera	steril	steril	Streptokokken	Kokken
Bac. subtilis	Bacillen	Bacillen	Meningokokken	Kokken
Tetanus	Bacillen	Bacillen	Diplokokken	Kokken
Prot. vulgaris	Bacillen	Bacillen	Pneumobacillen	Bacillen
				steril

5. Antagonistische Kraft.

Ich infizierte mit einer Platinöse einer dünnen Emulsion ein 5 ccm Pyocyanase enthaltendes Glasröhrchen; nach 3, bei einem Teil, und nach 14 Stunden bei dem anderen Teil der Keime habe ich Platten in einfachem Agar und in Glykoseagar angelegt. Nachdem diese Kulturen 4 Tage im Brutschranke bei 37° C geblieben waren, zählte ich die Kolonien. Folgende Zahlen stellen die Durchschnittszahl der Kolonien von 10 Platten dar:

	Zahl der Kolonien	
	nach 3 Stunden	nach 14 Stunden
Cholera	60	2
Staphylokokken	84	140
Diphtherie	16	0
Milzbrand	20	4
Typhus	80	50

Aus meinen Versuchen geht deutlich hervor, daß die Pyocyanase nur auf eine kleine Gruppe von pathogenen Mikroorganismen einwirkt und besonders auf den Diphtheriebacillus, wie schon Emmerich und Löw nachgewiesen hatten. Sie übt auch eine gewisse Wirkung auf den Milzbrandbacillus (*C. haematicus*) und auf den Choleravibrio aus; viel geringer ist die Wirkung auf die Meningokokken, auf den Eberth'schen Bacillus und auf den Pneumobacillus.

Die übrigen Mikroorganismen (*B. subtilis*, *Tetanusbacillus*, *Proteus vulgaris*, *Bacillus* von Koch, Staphylo-, Strepto- und Diplokokken) werden durch die bakterizide Wirkung der Pyocyanase keineswegs beeinflusst. Da aus meinen Untersuchungen hervorgeht, daß auch die Staphylo- und Streptokokken der Pyocyanase widerstehen, wird die Behauptung von Emmerich und Löw, daß die lokale Wirkung der Pyocyanase besonders bei diphtherischen Mischinfektionen, d. h. bei durch die Anwesenheit von Strepto- und Staphylokokken komplizierten Diphtherieinfektionen besonders nützlich ist, nicht bestätigt.

Bezüglich des Eberth'schen *Bacillus* geht aus meinen Beobachtungen hervor, daß der *Bac. pyocyaneus*, wenn er auch keinen besonderen Antagonismus gegen den Typhusbacillus aufweist, wie Rumpf behauptet, andererseits auch nicht die Eigenschaft besitzt, die Entwicklung dieses letzteren zu befördern, wie Besson meint, und daß die Pyocyanase auf die Typhusbacillen eine schwache bakterizide, hemmende und antagonistische Wirkung ausübt.

Die antagonistische Kraft der Pyocyanase, ihre Desinfektionskraft, ihre Fähigkeit, die Entwicklung von Kulturen zu hindern und bereits entwickelte Kulturen zu zerstören, bestätigen das, wenn auch nicht sehr hohe bakterizide Vermögen dieses therapeutischen Materials, in erster Linie gegen den Diphtheriebacillus, dann gegen den hämatischen Milzbrand und die Cholera und zuletzt gegen Meningokokken und Typhusbacillen. Die mehrmals wiederholten zahlreichen diesbezüglichen Versuche bestätigen diesen Befund, jedoch stets ausschließlich für diese wenigen Mikroorganismen.

Das bakterizide Vermögen der Pyocyanase gegen Diphtheriebacillen ist in vitro ziemlich ausgesprochen, weshalb man leicht begreift, daß man diesen Stoff als Heilmittel in der Behandlung der Diphtherie hat vorschlagen können. Wenn man jedoch darauf Rücksicht nimmt, daß die Wirkung der Pyocyanase nur lokal, antibakteriell und nicht antitoxisch ist, sieht man leicht ein, daß ihre therapeutische Wirksamkeit keine sehr große sein kann. Wenn man dann ihre bakterizide Wirkung nach den Ergebnissen meiner einzelnen Versuche beurteilt, geht aus denselben klar hervor, daß auch die bakterizide, desinfizierende, antagonistische und hemmende Wirkung, im Verhältnis zur Zeitdauer und zur angewendeten Menge von Pyocyanase sehr schwach ist, höchstens vergleichbar mit derjenigen von vielen anderen bereits gebräuchlichen Desinfizientien. Deshalb begreift man nicht, warum man dieses Material als ein besonderes therapeutisches Mittel bezeichnen und sogar fast als ein Spezifikum gegen die Bacillen von Loeffler empfehlen will.

Es kann sein, daß die Pyocyanase therapeutisch gewisse Dienste bei der Prophylaxe der Diphtherie leisten kann, indem man versuchen kann, durch lange fortgesetzte Einstäubungen von Pyocyanase die Loeffler'schen Bacillen zu zerstören, welche im Rachen der Rekonvaleszenten und der gesunden Bacillenträger vorhanden sind. Jedoch erfordert auch diese Annahme eine weitere Bestätigung.

Wenn man außerdem noch darauf Rücksicht nimmt, daß die schon an und für sich schwache lokale bakterizide Wirkung sich in vivo nicht so konstant und gleichmäßig wie in vitro zeigen kann, muß man zugeben, daß die therapeutische Wirksamkeit der Pyocyanase sehr schwach ist und sich dieses Präparat nicht für praktische Zwecke empfiehlt.

Literatur.

- Wassermann, Eine neue Art von antidiphtherischem Serum. (Deutsche med. Wochenschr. 1902. No. 44.)
Besson, A., Technique microbiologique. Paris.
Emmerich, Münch. med. Wochenschr. 1907. 5. Nov.
Propaganda Sanitaria. Una nuova terapia antidifterica.
Schapiro, L., Ueber das bakterizide Verhalten der Pyocyanase. (Hyg. Rundschau.)

Nachdruck verboten.

Ueber die antitryptische Wirkung verschiedener Tiergewebe und Tialbuminoide.

[Hygienisches Institut der Kgl. Universität Sassari.]

II. Mitteilung.

Von Prof. Claudio Fermi.

Durch verschiedene im Jahre 1891¹⁾ begonnene und während der Jahre 1895²⁾, 1897³⁾ fortgesetzte Forschungen wies ich als erster die antitryptische Wirkung der Organe sowie des Blutserums sowohl *intra vitam*, als auch *in vitro* nach. Bei Einspritzung von Trypsin subkute, oder in das Bauchfell (2 g jedesmal) fand ich Spuren hiervon nur bis $\frac{1}{2}$ Stunde nach der Einspritzung bei Meerschweinchen, sowie ebenfalls $\frac{1}{2}$ Stunde bei Fröschen; später aber nicht mehr. Fünf Meerschweinchen, denen $\frac{1}{2}$ g Trypsin in die Jugularis eingespritzt worden war, enthielten nach 5 Minuten aktives Trypsin in allen Organen, aber nicht mehr nach $\frac{1}{2}$ Stunde.

Von Trypsin, welches mit sehr frischen Organen (Milz, Leber, Nieren, Muskeln) vermischt und fein zerrieben wurde, konnte man nach 24 Stunden keine Spur mehr nachweisen, während sich in den Proben, in denen die erwähnten Organe vorher gekocht worden waren, noch eine deutliche Reaktion wahrnehmen ließ. Man kam auch zu dem Schlusse, daß das Enzym zerstört oder dauernd fixiert sei, da es nicht gelang, dasselbe durch Behandlung der Organe mit den gewöhnlichen Mitteln, die bei der Extraktion und der Isolierung der Enzyme aus den Drüsen, nämlich des Trypsins aus dem Pankreas, des Pepsins aus der Magenschleimhaut, zur Anwendung kommen, frei zu bekommen. Diese meine Versuche wurden nacheinander von Puliesi und Hahn, Cannés und Gley, Landsteiner u. a. bestätigt.

Hier will ich nun einige andere Versuche mitteilen, die den Zweck verfolgen, etwas Licht in die Frage über die Fixier- und antitryptische Wirkung der Tiergewebe und der Tialbuminoide in den verschiedenen Zuständen zu bringen. Ich führe hier nur die angestellten Untersuchungen nebst den entsprechenden Resultaten an und verschiebe den bibliographischen und den kritischen Teil sowie die Endschlüsse auf die folgende Mitteilung.

1) Weitere Untersuchungen über tryptische Enzyme der Mikroorganismen. (Arch. f. Hyg. Bd. XIV.)

2) Fermi, Claudio u. Pernossi, L., Studien über Enzyme. (Zeitschr. f. Hyg. Bd. XVIII. 1895.)

3) Fermi, Cl., Ueber die antienzymische Wirkung des Blutserums. (Centralbl. f. Bakt. etc. Abt. I. Bd. XXII. 1897. Heft 1.)

I. Antitryptische Wirkung verschiedener tierischer Gewebe.

Versuch 7. Juni 1907. Zu 5 ccm in Eproutetten befindlicher Grublerscher Trypsinlösung 1:10000 wird eine gewisse Menge einer der unten genannten fein zerschnittenen Gewebesteile hinzugefügt. Nach 5 Stunden werden jeder Eproutette 5 ccm 1-proz. Karbolsäure zugesetzt und nachher werden alle Eproutetten in gleicher Weise 3mal geschüttelt und (1 ccm) der Flüssigkeit wird in dünne Gelatineröhrchen (Gelatine 7 Proz., Natronkarbonat 0,5 Proz., Karbolsäure 1 Proz.) verteilt.

Die 108¹⁾ Gelatineröhrchen werden bei 20° gehalten und nach 5—10—15 Tagen wird die aufgelöste Gelatineschicht gemessen.

Die erhaltenen Resultate sind aus folgender Tabelle zu ersehen.

Die Millimeterzahl der verflüssigten Gelatineschicht entspricht der Mittelzahl von drei gleichen Proben, da jede Probe 3mal wiederholt wurde.

Organe	1 g			0,8 g			0,6 g			0,4 g		
	Nach Tagen			Nach Tagen			Nach Tagen			Nach Tagen		
	5	10	15	5	10	15	5	10	15	5	10	15
Darmschleimhaut		4,5	9,5		3,5	10		5	7,5		4,5	10
Herzmuskelsubstanz					3,5	7,5		2,5	5,2	1	5,2	8
Lebersubstanz		3	6		3	6	0,3	5	3,5	1,5	7	8,5
Magenschleimhaut	2,5	5	8,5		4	7		4	7		5	8,5
Nierensubstanz			2		5	2		2,2	7,5		5,5	8,2
Muskelsubstanz		5	8	1	6	9,5	3,5	9,5	10	2	6	9
Nervensubstanz	1,5	5,5	9	1	4,7	8	3	7	11,5	1,7	6,5	9,2
Milzsubstanz			2,2									
Kontrollversuche	5	11,5		3,5	9	15	1,7	8,2	12	1,5	6,2	9,2

Schlußfolgerungen.

1) Sämtliche untersuchte Gewebe weisen eine starke antitryptische Wirkung auf; in allen Trypsin enthaltenden und zuvor der Wirkung der Gewebe ausgesetzten Gelatineröhrchen war die Verflüssigung geringer, als in den nur Trypsin enthaltenden Röhrchen.

2) Die verschiedenen Organe lassen sich, je nach ihrer stärkeren Wirkung, in folgender Reihenfolge aufstellen: Zuerst das Nierengewebe und das Lebergewebe, dann das Herzgewebe und die Magenschleimhaut, sodann das Muskelgewebe und endlich die Hirnsubstanz und die Darmschleimhaut²⁾.

3) Die antitryptische Wirkung der verschiedenen Gewebe nimmt natürlich im Verhältnisse zur Menge derselben zu.

II. Antitryptische Wirkung lebender und toter tierischer Gewebe.

Versuch 27. Mai 1907. Zu 5 ccm in Eproutetten enthaltene Mercksche Trypsinlösung 1:10000 wird eine gewisse Menge eines der unten genannten Gewebeteile der Kröte hinzugefügt. Es wird sofort und 24 Stunden nach dem Tode des Tieres untersucht. Nach 5 und nach 24 Stunden wird (1 ccm) die Flüssigkeit in je 3 Gelatineröhrchen (Gelatine 7 Proz., Natronkarbonat 0,5 Proz., Karbolsäure 1 Proz.) verteilt und nachher jedem Gelatineröhrchen 1 ccm 1-proz. Karbolsäure hinzugefügt. Die Trypsinlösung wird in dieser Weise auf 1:20000 verdünnt.

Die 66 Gelatineröhrchen werden, wie gewöhnlich, bei 20° gehalten.

Nach 5—10—15 Tagen wird die aufgelöste Gelatineschicht gemessen.

Die Resultate gebe ich in nachfolgender Tabelle wieder:

1) Der Klarheit wegen führe ich stets die Zahl der gemachten Proben an.

2) Die Hirnsubstanz erweist sich als weniger aktiv, wahrscheinlich weil sie tatsächlich eine geringere fixatorische oder zerstörende Wirkung dem Trypsin gegenüber besitzt, und die Darmschleimhaut, weil sie selbst eine verflüssigende Wirkung besitzt.

Gewebe	Zugefügte Gewebemengen	Lebendige Gewebe			Tote Gewebe		
a) Nach 5-stündiger Wirkung.							
Hirnsubstanz	0,050 g	8,6	13	16,3	8,3	12,6	16,3
Magenschleimhaut	0,650 "	5	8,5	12	6,5	10,5	14
Darmschleimhaut	0,550 "	3,3	4,3	8	16	21	26
Muskelgewebe	1 "	3	5	8			8,6
Herzmuskel	0,0200 "	8,6	11,6	15,3	8	11,5	14
b) Nach 24-stündiger Wirkung.							
Hirnsubstanz	0,050 g	7	10	14	7	11	14
Magenschleimhaut	0,650 "	0,5	3	5	2	6	9
Darmschleimhaut	0,550 "	8	11	15	17	24	30
Muskelgewebe	1 "			2,5	0,5		6
Herzmuskel	0,0200 "	8	14	16	5,5	8	11
Kontrollversuch		9,6	14,6	18			

Schlußfolgerungen.

1) Wie gewöhnlich, zeigten sich sämtliche untersuchte Tiergewebe (mit Ausnahme der Darmschleimhaut) mit einer tryptofixatorischen oder antitryptischen Wirkung begabt; das der Wirkung unterworfenen Trypsin verflüssigt weniger als allein.

2) In der stärkeren antitryptischen Wirkung nahm das Muskelgewebe die erste Stelle ein, dann folgte die Magenschleimhaut, hierauf das Herzgewebe, die Hirnschubstanz und zuletzt die Darmschleimhaut.

3) Gewöhnlich üben die lebenden ¹⁾ Substanzen eine zweimal höhere antitryptische Wirkung aus als die toten Gewebe. Ausnahmen bildeten die Darmschleimhaut (5-stündige Wirkung) und das Herzgewebe (5- bis 24-stündige Wirkung), die lebend eine sehr leichte, den toten nachstehende antitryptische Wirkung aufwiesen.

4) Die antitryptische Wirkung nahm gewöhnlich bei Verlängerung der Dauer des Wirkungskontaktes zu. Sämtliche Gewebe, mit Ausnahme der Darmschleimhaut ²⁾, und zwar sowohl die lebenden als auch die toten, waren etwas aktiver bei einer Wirkungsdauer von 24 Stunden, als von 5 Stunden.

III. Antitryptische Wirkung einiger Darmwürmer (Taeniae) unter verschiedenen Umständen.

Das antitryptische Vermögen, das durch Weinland bei einigen Darmwürmern gefunden hatte, regte mich an, einige Versuche anzustellen.

Zu 3 ccm in Eproutetten enthaltene Grüblersche Trypsinlösung 1:1000 und 1:10000 wird 1 g von *Taenia ovis* und von Fibrin (als Vergleichsprobe) zugesetzt.

Diese Versuche werden mit den oben genannten Stoffen im zerriebenen und im nicht zerriebenen Zustande und mit und ohne Karbolsäurezusatz angestellt.

Sofort und 24 Stunden nach der Wirkung wird die Flüssigkeit in je 3 Gelatine-röhrchen (1 ccm) verteilt.

Die 98 Gelatineröhrchen werden bei 20° gehalten und nach 5—10—15 Tagen wird die aufgelöste Gelatineschicht gemessen.

Die erhaltenen Resultate sind aus folgender Tabelle zu sehen:

1) Das Adjektiv lebend ist hier nur der Bequemlichkeit halber angewandt.

2) Die Darmschleimhaut förderte beständig die Tätigkeit der Enzyme, kraft ihrer eigenen Enzyme (Gelatinolytisch und Enterokynase).

a) Trypsinlösung 1:1000.

Organe	Mit Karbolsäurezusatz											
	Zerrieben						Nicht zerrieben					
	Sogleich nach der Mischung			24 Std. nach der Mischung			Sogleich nach der Mischung			24 Std. nach der Mischung		
	Nach Tagen			Nach Tagen			Nach Tagen			Nach Tagen		
	5	10	15	5	10	15	5	10	15	5	10	15
Fibrin	10,5	15	23,5	10,5	16	26				10	17,5	17
Taenia	8,5	13	21	9	14	22	9,5	14	22	8	17	20,5
Kontrollversuche												
Mit Karbolsäurezusatz		12,3	27									
Ohne Karbolsäurezusatz	6	7,6	23,3									

Organe	Ohne Karbolsäurezusatz											
	Zerrieben						Nicht zerrieben					
	Sogleich nach der Mischung			24 Std. nach der Mischung			Sogleich nach der Mischung			24 Std. nach der Mischung		
	Nach Tagen			Nach Tagen			Nach Tagen			Nach Tagen		
	5	10	15	5	10	15	5	10	15	5	10	15
Fibrin	10,5	15	26	10	13	19	9,5	13,5	22,5			
Taenia	10	15	20,5	8,5	13,5	20,5				5,5	10	17

b) Trypsinlösung 1:10000

Organe	Mit Karbolsäurezusatz											
	Zerrieben						Nicht zerrieben					
	Sogleich nach der Mischung			24 Std. nach der Mischung			Sogleich nach der Mischung			24 Std. nach der Mischung		
	Nach Tagen			Nach Tagen			Nach Tagen			Nach Tagen		
	5	10	15	5	10	15	5	10	15	5	10	15
Fibrin		6,5	12		9	10,5	6,5	9,5	14,5	2,5	5,5	10,5
Taenia	2,5	4,5	11,5		5	9	3	6,5	11	3	6,5	13
Kontrollversuche												
Mit Karbolsäurezusatz	5	8,6	15,6									
Ohne Karbolsäurezusatz		4	14									

Organe	Ohne Karbolsäurezusatz											
	Zerrieben						Nicht zerrieben					
	Sogleich nach der Mischung			24 Std. nach der Mischung			Sogleich nach der Mischung			24 Std. nach der Mischung		
	Nach Tagen			Nach Tagen			Nach Tagen			Nach Tagen		
	5	10	15	5	10	15	5	10	15	5	10	15
Fibrin		1,5	7			4,5	2,5	5	11	2	3	8,5
Taenia	4,5	8	15,5	5,5	9	15	2	4	10	2	4,7	9,5

Schlußfolgerungen.

1) Einige Eingeweidewürmer (Bandwurm) und das Fibrin erscheinen mit einer tryptofixatorischen oder antitryptischen Fähigkeit begabt.

2) Die Bandwürmer weisen, mit wenigen Ausnahmen, eine stärkere antitryptische Tätigkeit auf, als das Fibrin.

3) In Versuchen mit Trypsin 1:10000 setzte die Karbolsäure die antitryptische Tätigkeit des Fibrins beständig und die des Bandwurms unbeständig herab. Diese schädliche Wirkung war in den Versuchen mit Trypsin (1 Prom.) nicht sichtbar. Man kann daher zu dem Schlusse kommen, daß eine schädliche Wirkung der Karbolsäure nur auf sehr verdünnte Lösungen nachweisbar war.

4) Das Zerkneten der Gewebe verminderte beständig die antitryptische Tätigkeit, wenn das Trypsin 1-prom. war, vermehrte sie hingegen (beständig beim Fibrin und unbeständig beim Bandwurm), wenn das Trypsin 1:10000 war.

Vielleicht kann man die stärkere Verflüssigung (Herabsetzung der antitryptischen Tätigkeit) durch die zerkneteten Gewebe durch eine stärkere Fällung des Trypsins auf Gelatine erklären. Auch die Kohle fällt aus der festen Gelatine größere Mengen von Trypsin, wenn sie gepulvert ist, als wenn sie in Stücken ist.

IV. Antitryptische Wirkung einiger albuminoider Stoffe.

Versuch vom 30. Mai 1907. — Zu 6 ccm in Eproutetten befindliche Grublersche Trypsinlösung 1:10000 mit 1-proz. Karbolsäurezusatz werden 1—2—3—4—5—6 Zehntel der unten genannten Eiweißemulsion (15 g und 30 ccm 20-proz. Karbolsäure) zugefügt.

Sofort und nach 24 Stunden wird die Flüssigkeit (1 ccm) in 3 Gelatineröhrchen verteilt.

Die 270 Gelatineröhrchen werden bei 20° gehalten und alle 5—10—15 Tagen wird die aufgelöste Gelatineschicht gemessen.

Die erhaltenen Resultate sind aus folgender Tabelle zu ersehen:

Substanzen	a) Sogleich nach der Mischung.																	
	Zahl der Substanzzehntel.																	
	1			2			3			4			5			6		
	Nach Tagen			Nach Tagen			Nach Tagen			Nach Tagen			Nach Tagen			Nach Tagen		
	5	10	15	5	10	15	5	10	15	5	10	15	5	10	15	5	10	15
Eich	4	9	14	4,6	9,6	15	3,6	8,3	13	4,3	8,3	13,6	3,8	7,5	12	3,1	7	11,6
Kotter	3,8	9,6	14,3	2,3	6,6	11,3	1,5	5,4	10,3	1,6	3,6	10	—	4,6	9	—	4,5	9,3
Kornweiß	—	2	6	—	1	3	—	—	2	1,5	3,7	6,1	—	—	—	—	—	—
Woll	6,3	9,5	14,6	—	5,8	11	—	6,3	11	—	5	9,6	—	5	9,3	—	4	8
Woll	4,6	10,3	15,3	4	9,6	14,3	3,3	8	12,3	3,5	8,8	14	3,3	8,6	13,3	3,1	7,8	12,6
Woll	—	7,5	12	—	3	7	—	6,5	11	—	3	7	—	3,5	7,5	—	4	7,5
Woll	—	—	17	6	—	16	4,5	—	16	3	—	13,5	1	—	8,7	3,2	—	6,5
Kontrollversuche Trypsin allein 1:10000	1,7	6	10	0,5	5,5	10,5	1,2	6	10,5	1,2	6,5	11	0,75	5,5	10	0,75	6	10
Substanzen	b) 24 Stunden nach der Mischung.																	
	1			2			3			4			5			6		
	Nach Tagen			Nach Tagen			Nach Tagen			Nach Tagen			Nach Tagen			Nach Tagen		
	5	10	15	5	10	15	5	10	15	5	10	15	5	10	15	5	10	15
	5	10	15	5	10	15	5	10	15	5	10	15	5	10	15	5	10	15
Eich	2,5	6,5	11,2	2,5	7	11	2,7	6,5	11	2	6	10,5	2,7	6	10,5	2	5,5	9,7
Kotter	2,2	8	12	1,7	6	11,2	2	7	12,5	1,7	6,5	10,5	—	4,7	8,7	—	4,5	9,2
Kornweiß	1,2	3,2	8	—	—	3	—	—	3,7	—	1,7	5,5	—	—	—	—	—	—
Woll	—	5,5	10	—	5,5	10,5	—	5	8	—	5,5	10,5	—	5,5	10,5	—	5	9
Woll	2	7,6	11,3	2	6,6	11	1,8	6,6	10,6	1,8	8	11,3	1,8	6,3	10,6	1,8	5,6	11
Woll	5	8,5	12,5	4,5	8,5	11,7	4	7,5	11,2	2,7	5,5	9	—	2,2	4,5	0,5	3	4,5
Kontrollversuche	—	8	13	—	—	14	—	8	13	—	11	15	—	9	15	—	8	13

Schlußfolgerungen.

1) Der größeren antitryptischen Tätigkeit nach würden die verschiedenen Albuminoide folgende Reihenfolge einnehmen: Bandwurm — Eigelb — Milch — Kasein.

2) Die antitryptische Tätigkeit der verschiedenen Albuminoide stieg mit der Zunahme der Menge derselben. Das Maximum der antitryptischen Gewalt zeigte sich gewöhnlich mit $\frac{1}{10}$ und das Maximum mit $\frac{1}{10} - \frac{2}{10}$.

Bei einem Kontakte von 24 Stunden wiesen sämtliche untersuchte Albuminoide eine konstante antitryptische Tätigkeit auf.

Bei einem Kontakte von wenigen Minuten hingegen entfalteten sie eine antitryptische Tätigkeit nur in 14 von 26 Fällen. In den 12 Fällen von geringerer Kraft waren die Unterschiede mit der Kontrolle (Trypsin allein) nicht groß, selbst wenn man berücksichtigt, daß sich zwischen den Kontrollröhrchen selbst stets einige Unterschiede im Grade der Verflüssigung vorfanden. Man kann demnach zu dem Schlusse kommen, daß die erwähnten Albuminoide eine gewisse antitryptische Tätigkeit ausübten.

V. Tryptofixatorische und antitryptische Wirkung der verschiedenen Tiergewebe.

Da das Verschwinden oder die Verminderung des Trypsins in den verschiedenen versuchten Verdünnungen mittels der Gewebe und der Albuminoide sowohl als eine durch die antitryptische Wirkung verursachte Zerstörung oder Neutralisierung, als auch als eine mehr oder weniger beständige Fixierung von seiten derselben erklärt werden kann, wie dies mechanisch auch viele indifferente Substanzen tun (Kohle, Papier etc.), versuchte ich, die Frage zu entscheiden, indem ich nicht nur die Menge des aus den verschiedenen Lösungen verschwundenen Trypsins, infolge der Wirkung der eingetauchten Gewebe, mittels des Gelatineröhrchenverfahrens feststellte, sondern auch die tryptofixatorische Wirkung derselben mittels des Gelatineplattenverfahrens durch direkte Prüfung der verflüssigenden Wirkung und vorhergehendes Eintauchen in das Trypsin untersuchte.

A. Verflüssigende Wirkung der Gewebe nach Eintauchen in das Trypsin.

Versuch vom 8. Jan. 1908. In Röhrchen, welche 10 ccm Grüblersches Trypsin pro Mille, Karbolsäure (1-proz.) enthalten, werden 6 Stückchen von ungefähr je 3 mm Durchmesser der verschiedenen obengenannten Organe gelegt. Sofort, nach 5 und nach 24 Stunden wird die tryptofixatorische oder tryptophore Wirkung der verschiedenen Organe geprüft, indem ich von den verschiedenen Organen je drei Stückchen nebeneinander auf feste Gelatinescheiben legte, oder indem ich 1 ccm der Flüssigkeit (Trypsinlösung), die in den Reagenzgläsern enthalten war, in Röhrchen, welche die gleiche feste Gelatine enthielten, goß. Hierauf wird die in den Reagenzgläsern zurückbleibende Flüssigkeit mit Karbolsäure verdünnt, und zwar so, daß die Verdünnung des Trypsins auf 1:10 000 gebracht wird. Die Röhrchen werden dann wieder weggesetzt. Sowohl die Gelatineplatten als auch die 198 Reagiergläser werden in eine Temperatur von 20° gebracht. Die Platten werden alle 5 Stunden nachgesehen und alle 5 Tage wird die aufgelöste Schicht in den Röhrchen gemessen.

Die Ergebnisse sind in den folgenden Tabellen aufgeführt:

Tierische Gewebe	Ohne Trypsinimmersion	Nach Trypsinimmersion		
	Kontrollversuch	Einige Sekunden	5 Stunden	24 Stunden
Hirnsubstanz	000	000	++0	++0
Herzmuskel	000	000	000	000
Muskelgewebe	000	+++	+++	+++
Lungengewebe	000	000	000	+00
Lebergewebe	000	000	000	000
Milzgewebe	000	000	+++	+++
Magenschleimhaut	000	+—0	+++	+++
Darmschleimhaut	000	+—0	+++	+++
Nierengewebe	000	000	000	000
Fibrin	000	+++	+++	+++
Hautgewebe	000	000	+++	+++

Schlußfolgerungen.

1) Die 11 Gewebe allein (ohne Trypsin) verursachten keine Spur von Verflüssigung.

2) Sie verflüssigten hingegen, wenn sie einige Sekunden lang in Trypsin von 1 pro Mille gelassen wurden, die Magenschleimhaut, die Darmschleimhaut, das Muskelgewebe und das Fibrin. Die Hirnschubstanz, das Nierengewebe und das Hautgewebe wiesen hingegen keine Spur von Verflüssigung auf.

Nach einer 5-stündigen Immersion in Trypsin wurden ebenfalls die Hirnschubstanz, das Milzgewebe, das Hautgewebe und das Fibrin verflüssigt. Ein vollständig negatives Resultat ergaben hingegen das Herzgewebe, das der Leber, der Lunge und der Niere.

Nach einer Immersion von 24 Stunden endlich in Trypsin verflüssigten sich sämtliche Organe, mit Ausnahme des Herz-, Leber- und Nierengewebes. Das Lungengewebe hat nur eine leichte Spur von Verflüssigung gegeben.

Ich wiederholte diesen Versuch mit einer leichten Abänderung, wie folgt:

Versuchsmethode: Reagiergläsern mit 5 ccm Trypsin von 1 pro Mille fügt man 1 g von einem der verschiedenen Kaninchenorgane, sehr fein gehackt, hinzu. In einem anderen Teile dieser Röhrchen fügt man sofort 5 ccm 1-proz. Karbolsäure bei, und einem anderen Teile nach 5, 6 und 24 Stunden. Auf eine harte Gelatineplatte wurden 3 Stückchen der verschiedenen Organe gelegt. Die Gelatineplatten wurden in eine Temperatur von 20° gebracht und alle 5 Stunden nachgesehen, welche von den verschiedenen Organen sich verflüssigt haben oder nicht.

Gewebe	Kontrollversuch ohne Trypsinimmersion	Karbolsäurezusatz			
		Sogleich		Nach 5 Stunden	
		Gelatineplatten nach		Gelatineplatten nach	
		6 Stunden	24 Stunden	6 Stunden	24 Stunden
Muskel	000	++	++	++	++
Herz	000	00	00	00	++
Leber	000	00	00	00	00
Milz	000	++	++	++	++
Nieren	000	00	00	00	00
Magenschleimhaut	000	++	++	++	++
Darmschleimhaut	+++	++	++	++	++
Saccharomyces cerevisiae	000	++	++	++	—+—+

Resultat: Die Gelatine verflüssigten: Magenschleimhaut, Milz, Darmschleimhaut, dagegen verflüssigten nicht wie gewöhnlich Leber, Herz und Niere. Das Herz hatte erst nach 28 Stunden verflüssigt. Wie man sieht, bestätigen diese Resultate die der vorigen Versuche.

Man kann daher den Schluß ziehen, daß die höchste übertragende Wirkung oder die geringere antitryptische Wirkung bei der Magenschleimhaut, der Darmschleimhaut, dem Muskelgewebe und dem Fibrin wahrgenommen wurde; hierauf käme das Hautgewebe und das Nierengewebe, während das Herz-, Leber- und Nierengewebe und vielleicht auch das der Lunge eine wirkliche antitryptische oder beständig fixierende Wirkung ausgeübt hätten. Ich betone, daß es sich in allen Fällen um eine antitryptische oder fixierende Wirkung und nicht um einen einfachen Uebertragungsmechanismus handelt, denn wie wir jetzt sehen werden, neutralisierten genannte Organe vollständig die Trypsinlösung, in welche sie gelegt wurden.

B. Verflüssigende Wirkung der Trypsinlösung nach Entfernung der eingetauchten Gewebe.

	Trypsinlösung 1:1000			Trypsinlösung 1:10000		
	Zeit der Gegenwirkung auf Trypsin					
	Einige Minuten	5 Stunden	24 Stunden	Einige Minuten	5 Stunden	24 Stunden
1) Nervensubstanz	28	22,3	22,6	14	13,6	11,5
2) Herzmuskel	16	9	14	2	4,6	2,6
3) Lungengewebe	17,3	14,3	15	4,6	4	4,3
4) Lebergewebe	19,3	12,5	15	0	0	0
5) Magenschleimhaut	23	21	20,3	6,3	6,6	5
6) Milzgewebe	27,3	26	24	11,5	12,6	12
7) Darmschleimhaut	20,6	20,3	20,6	8,5	10	9
8) Nierengewebe	15,6	4,6	14	0	0	0
9) Muskelgewebe	20,6	23,3	20,3	9	0	9,3
10) Hautgewebe	19,6	22	20,3	8,5	10	9,3
11) Blutfibrin	21	21,5	19,3	8	8,6	6,5

Schlußfolgerungen.

Der höheren antitryptischen Wirkung nach nehmen die verschiedenen untersuchten Gewebe, von den aktiveren angefangen, folgende Reihenfolge ein:

1) Nierengewebe, 2) Herzgewebe, 3) Lebergewebe, 4) Lungengewebe, 5) Hautgewebe, 6) Darmschleimhaut, 7) Magenschleimhaut, 8) Blutfibrin, 9) Muskelgewebe, 10) Milzgewebe, 11) Nervengewebe.

Das Wesentlichste, nämlich, daß Nierengewebe, Herzgewebe und Lebergewebe stets die stärkste, Milzgewebe und Nierengewebe hingegen die geringste antitryptische Wirkung aufweisen, wurde vollkommen bestätigt.

Nachdruck verboten.

Untersuchungen über Phenostal (Karbolsäuretabletten) und seine keimtötende Wirkung.

[Aus dem Untersuchungsamt des Hygienischen Institutes der
Universität Freiburg i./Br.]

Von Dr. med. E. Küster, Privatdozent.

Wenngleich in den letzten Jahren die chemische Industrie unablässig bemüht war, neue Desinfektionsmittel zur Einführung zu bringen, so kann doch wohl niemand behaupten, daß wir an sicher wirksamen und praktisch brauchbaren Desinfizientien eine große Auswahl hätten.

Die Anforderungen, die man heute an ein gutes Desinfizient zu stellen pflegt, sind gegen früher beträchtlich gestiegen: Die Erweiterung unserer Kenntnisse über die Biologie der Krankheitserreger und über die Infektionswege bei ansteckenden Krankheiten verlangen von einem brauchbaren Desinfektionsmittel, daß es in kleinsten Mengen und unter allen praktisch vorkommenden Verhältnissen energisch keimtötend wirkt, daß es bei etwaiger Resorption durch die Körpergewebe möglichst ungiftig sei und auch bei längerer Anwendung Hände und Instrumente nicht angreife; dazu noch fordert der kulturelle Fortschritt unserer Zeit, daß ein solches Mittel in kompensiöser Form, möglichst ausgiebig und dabei unauffällig, d. h. geruchlos sei.

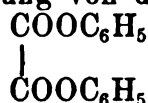
Betrachten wir nun, wie die verschiedenen gebräuchlichen Desinfizientien diesen umfassenden Anforderungen gerecht werden, so ergibt sich, daß alle mehr oder weniger versagen: Sublimat und seine Verwandten wirken zwar sehr gut bakterientötend, aber nur in wässerigen Lösungen, sie sind dabei außerordentlich giftig und verderben die Schärfe der Instrumente; Karbolsäure wirkt gut auch in eiweißhaltigen Lösungen, wird aber von den Körpergeweben zu leicht resorbiert und gibt zu Vergiftungen Anlaß; dazu kommt noch, daß ihr ein sehr intensiver Geruch anhaftet, der vielen Menschen widerwärtig ist und die Anwendung der Karbolsäure häufig untunlich erscheinen läßt. Den Kresolen, dem Lysol und ähnlich zusammengesetzten Desinfektionsmitteln haften ähnliche Mängel an, wenn sie auch weniger giftig und der Karbolsäure zum Teil an Desinfektionskraft überlegen sind; Formalin hat zu starke Aetzwirkung und belästigt auch durch seine reizenden Dämpfe die Respirations-schleimhäute; Lysoform hat einen praktisch zu geringen Desinfektionswert. Man hat eben an jedem der gebräuchlichen Desinfizientien irgend etwas auszusetzen und so erklärt sich das dauernde Interesse, welches man jedem neuen Desinfektionsmittel entgegenbringt.

In besonderem Maße scheint mir dies bei einem vor etwa Jahresfrist von der Firma Schülke & Mayr unter dem Namen Karbolsäuretabletten in den Handel gebrachten Desinfektionsmittel der Fall zu sein, denn schon mehrere Arbeiten, die sich mit der Prüfung der Desinfektionskraft von Karbolsäuretabletten befassen und zu einem günstigen Gesamturteil gelangt sind, sind bereits darüber erschienen.

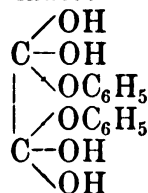
Auch im hiesigen Untersuchungsamt des hygienischen Institutes wurden im Laufe des letzten Jahres eine große Anzahl von Versuchen mit diesen Karbolsäuretabletten angestellt, deren wesentliche Ergebnisse im folgenden mitgeteilt seien.

Die Karbolsäuretabletten (Diphenyloxalester) oder Phenostal sind nach Angabe von Schneider (Hyg. Centralbl. Bd. IV. 1908) chemisch betrachtet ein Ester der Karbolsäure, und zwar der neutrale Oxalester derselben. In ihm sind 2 Moleküle der Karbolsäure durch 1 Molekül Oxalsäure zu einer labilen chemischen Verbindung vereinigt. Die Karbolsäuretablette hat einen Schmelzpunkt von $122-124^{\circ}$, ist nicht hygroskopisch und ätzt im Vergleich zur festen Karbolsäure oder der verflüssigten 90-proz. Karbolsäure sehr wenig. Löst man den Diphenyloxalester in Wasser, so zerfällt er in seine Bestandteile und man erhält Karbolsäurelösungen, die eine gegenüber den üblichen Karbolsäurelösungen auf das ca. 4—5-fache gesteigerte Desinfektionswirkung aufweisen. Die Steigerung der Desinfektionskraft kommt durch Zusammenwirken von Karbolsäure und Oxalsäure zustande. Von letzterer sind in dem Ester 32 Proz. enthalten. Die Desinfektionslösungen, welche aus dem Diphenyloxalester erhalten werden, bestehen demnach zu 68 Proz. aus Karbolsäure und zu 32 Proz. aus Oxalsäure. Als besonders bemerkenswert wird hervorgehoben, daß die Lösungen auch in hohem Grade die Eigenschaft besitzen, Sporen von Krankheitserregern abzutöten. Im Wasser zerfallen die Tabletten sehr rasch, beim Umrühren tritt leicht Lösung ein.

Wir unterzogen zunächst diese Angaben über die chemische Zusammensetzung der Karbolsäuretabletten einer Nachprüfung. Nach Beilstein, Handb. d. Chemie. III. Aufl., ist der Diphenyloxalester eine wasserunlösliche Verbindung, in der 2 Moleküle Phenyl mit 1 Molekül wasserfreier Oxalsäure zum Ester verbunden sind; der Schmelzpunkt liegt bei 130° . Diese Verbindung von der Zusammensetzung



konnte hier nicht vorliegen, denn einmal sind die Karbolsäuretabletten leicht wasserlöslich und eine wiederholte Schmelzpunktbestimmung ergab im Mittel $126,5^{\circ}$. Gerade diese Schmelzpunktbestimmung wies uns auf den richtigen Weg, denn der gefundene Temperaturgrad stimmt gut überein mit dem Schmelzpunkt, der für Orthooxalsäurediphenylester (d. h. dem Diphenylester der wasserhaltigen Oxalsäure) angegeben ist, nämlich $126-127^{\circ}$. Da nun dieser letztgenannte Ester auch als gut wasserlöslich beschrieben wird, so lag augenscheinlich eine ungenaue Angabe der Fabrik über die Zusammensetzung des Präparates vor. Die weitere Untersuchung bestätigte diese Annahme. Die hypothetische Strukturformel für Orthooxalsäurediphenylester (wenn man annimmt, daß das Wasser nicht als Kristallwasser, sondern als Bestandteil des Moleküls der Verbindung vorhanden ist) lautet



Sie besteht also aus $\text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{O}_6$. Aus dieser Formel berechnet sich ein Prozentgehalt der Verbindung von C = 60,43 Proz. und H = 5,03 Proz. Zur weiteren Aufklärung wurde eine Elementaranalyse der Substanz ausgeführt und diese ergab folgende Werte:

C = 57,61 Proz. H = 5,07 Proz.

Die Kontrollbestimmung:

C = 57,76 Proz. H = 5,19 Proz.

Die berechneten und durch Elementaranalyse gefundenen Werte lassen sich gut in Einklang bringen. Die Differenz der Werte erklärt sich wahrscheinlich aus einer geringen Verunreinigung der Tabletten. Berechnet man für den Diphenylester der wasserhaltigen Oxalsäure die Gewichtsprozente von Phenol und Oxalsäure, so ergeben sich folgende Größen: Die Verbindung enthält 67,62 Proz. Phenol (C_6H_5OH) und 32,38 Proz. wasserfreie Oxalsäure (entsprechend 45,33 Proz. der gewöhnlichen wasserhaltigen Oxalsäure). Diese Zahlen stimmen nun wieder überein mit den von Schneider angegebenen Werten von 68 Proz. Phenol und 32 Proz. Oxalsäure und wir können somit behaupten, daß die von Schülke & Mayr in den Handel gebrachten Karbolsäuretabletten aus Orthooxalsäurediphenylester bestehen.

Nach diesen Voruntersuchungen über die chemische Natur der Karbolsäuretabletten wurden folgende Versuche durchgeführt:

Versuch I. Zu 100 ccm einer 2-proz. wässrigen Karbolsäurelösung wurde 1 ccm einer 18-stündigen Typhusbacillenbouillonkultur hinzugefügt, in bestimmten Zeiträumen bei Zimmertemperatur Proben steril entnommen und auf den Keimgehalt untersucht. Diese Untersuchung fand in der Weise statt, daß je 1 Tropfen der mit Typhusbacillen infizierten wässrigen Karbolsäurelösung in ein Röhrchen mit Schrägagar gebracht, mit dem Kondenswasser desselben vermischt über die Nährbodenoberfläche ausgebreitet wurde. Mit 1 Tropfen des Kondenswassers des ersten Röhrchens wurde dann ein zweites Schrägagarröhrchen in der gleichen Weise beschickt. Ganz der gleiche Versuch wurde mit einer 2-proz. wässrigen Lösung von Karbolsäuretabletten durchgeführt.

Resultat: Schon nach 5 Minuten waren in beiden Lösungen alle Keime abgetötet.

Versuch II. Zu 200 ccm einer 0,5-proz. wässrigen Karbolsäurelösung wurde 1 ccm einer 18-stündigen Typhusbacillenbouillonkultur gegeben und wie im Versuch I bei Zimmertemperatur in bestimmten Zwischenräumen auf den Keimgehalt untersucht. Der gleiche Versuch wurde mit 0,5-proz. wässriger Karbolsäuretablettenlösung durchgeführt.

Resultat: 0,5-proz. Karbolsäurelösung tötet Typhusbacillenreinkultur noch nicht nach 45 Minuten ab; 0,5-proz. Karbolsäuretablettenlösung unter den gleichen Bedingungen schon nach 5 Minuten.

Versuch III. Zu 400 ccm Wasser, in dem eine Karbolsäuretablette aufgelöst war, wurde 1 ccm Typhusbacillenbouillonkultur gegeben und wie bisher bei Zimmertemperatur die Desinfektionskraft festgestellt.

Resultat: 0,25-proz. Lösung einer Karbolsäuretablette tötet Typhusbacillen in wässriger Aufschwemmung in 5 Minuten ab.

Versuch IV. Zu 600 ccm Wasser werden 1 ccm Karbolsäure (krist.) und 2 ccm Typhusstuhlaufschwemmung gegeben und nach der bisher geübten Methode bei Zimmertemperatur die Desinfektionswirkung untersucht. Der gleiche Versuch wurde mit einer gleich konzentrierten Lösung von Karbolsäuretabletten durchgeführt.

Resultat: 0,17-proz. Karbolsäure tötet die Keime in wässriger Typhusstuhlaufschwemmung in 1½ Stunden nicht ab, während 0,17-proz. Karbolsäuretablettenlösung schon in 10 Minuten unter den gleichen Umständen alle Keime vernichtet.

Es ergab sich also, daß in wässrigen Lösungen der Diphenyloxal-ester der reinen Karbolsäure an Desinfektionskraft weit überlegen ist. Es war aber noch festzustellen, um wieviel die Karbolsäuretabletten besser keimtötend wirkten und ob man die gleich gute Wirkung auch dann konstatieren könne, wenn man die Einwirkung des Desinfektionsmittels auf die Mikroorganismen nicht wie bisher in Wasser, sondern in einer 50 Proz. Nährbouillon enthaltenden Lösung vor sich gehen ließe.

Außerdem war bei der bisher geübten Methode der Untersuchung

auf den Keimgehalt nicht ausgeschlossen, daß zugleich mit dem zur Probe entnommenen Tropfen der infizierten Lösung auch noch eine gewisse Menge des Desinfektionsmittels auf die Schrägagarröhrchen mit übertragen wurde, so daß eine Hemmung der Keime nicht ausgeschlossen erschien. Wir verwandten deswegen zur Untersuchung auf den Keimgehalt bei den folgenden Versuchen sterile Nährbouillon in einer aus dem Versuch ersichtlichen Weise.

Versuch V. Zu 15 ccm dicht gewachsener 24-stündiger Coli-Bacillenbouillon wurden 15 ccm einer 0,5-proz. wässrigen Lösung von Karbolsäuretablettten gemischt; ebenso wurde eine 3-proz. Karbolsäurelösung und eine 2-proz. Karbolsäurelösung (in Wasser) mit je gleichen Teilen von derselben Coli-Bacillenbouillonkultur versetzt. Die 3 Mischungen wurden bei Zimmertemperatur gehalten. In den aus der Tabelle ersichtlichen Zeiten wurden mit steriler Pipette jeweils 0,5 ccm zur Probe entnommen und in 5 ccm sterile Nährbouillon gebracht. Dieses Bouillonröhrchen wurde gründlich durchgeschüttelt und dann 0,5 ccm seines Inhaltes in ein zweites Röhrchen mit 5 ccm steriler Nährbouillon gebracht. Alle Bouillonröhrchen wurden bei 37° bebrütet.

Zeit der Entnahme	Karbolsäuretablette 0,25 Proz.		Karbolsäure 1 Proz.		Karbolsäure 1,5 Proz.	
	Röhr- chen I	Röhr- chen II	Röhr- chen I	Röhr- chen II	Röhr- chen I	Röhr- chen II
Nach 3 Minuten	+	+	+	+	+	+
" 5 "	+	+	+	+	+	+
" 15 "	+	+	+	+	—	—
" 25 "	+	+	+	+	—	—
" 40 "	+	+	+	+	—	—
" 60 "	+	+	+	+	—	—
" 1 St. 25 Min.	+	+	+	+	—	—
" 1 " 55 "	+	+	+	+	—	—
" 2 " 30 "	+	+	+	+	—	—
" 3 " 10 "	+	+	+	+	—	—

Versuch VI. Gleiche Art der Versuchsanordnung unter Prüfung auf Keimfreiheit, nur daß andere Konzentrationen des Desinfektionsmittels in Anwendung kommen.

Zeit der Entnahme	Karbolsäuretablette 0,25 Proz.		Karbolsäure 1 Proz.		Karbolsäure 1,5 Proz.	
	Röhr- chen I	Röhr- chen II	Röhr- chen I	Röhr- chen II	Röhr- chen I	Röhr- chen II
Nach 2 Minuten	+	+	+	+	+	+
" 5 "	+	+	+	+	+	+
" 10 "	+	+	+	+	—	—
" 20 "	+	+	+	+	—	—
" 40 "	+	+	+	+	—	—
" 80 "	+	+	+	+	—	—
" 120 "	+	+	+	+	—	—
" 180 "	+	+	+	+	—	—

Versuch VII. Anordnung wie bei Versuch VI. Aenderung der Konzentrationsgrade der Desinfektionsmittel.

Zeit der Entnahme	Karbolsäuretablette 0,75 Proz.		Karbolsäuretablette 1,0 Proz.		Karbolsäuretablette 1,5 Proz.	
	Röhr- chen I	Röhr- chen II	Röhr- chen I	Röhr- chen II	Röhr- chen I	Röhr- chen II
Nach 2 Minuten	+	+	+	+	—	—
" 5 "	+	+	+	+	—	—
" 15 "	+	+	—	—	—	—
" 30 "	+	—	—	—	—	—
" 60 "	—	—	—	—	—	—

Zeit der Entnahme	Karbolsäure 1,25 Proz.		Karbolsäure 1,5 Proz.	
	Röhrchen I	Röhrchen II	Röhrchen I	Röhrchen II
Nach 2 Minuten	+	+	+	+
" 5 "	+	+	—	—
" 15 "	+	+	—	—
" 30 "	+	—	—	—
" 60 "	—	—	—	—

Resultat: Aus diesen drei letzten Versuchen ist zu schließen, daß Diphenyloxalester in einer 50 Proz. Nährbouillon enthaltenden Lösung für Coli-Bacillen erst in einer Konzentration von 0,75 Proz., und zwar nach 30 Minuten keimtötend wirkt. Karbolsäure entfaltet unter den gleichen Umständen erst bei einer Konzentration von 1,25 Proz. dieselbe Wirkung. Es ist also unter diesen Versuchsbedingungen der Diphenyl-orthooxalester der reinen Karbolsäure um ein Geringes überlegen. Seine Desinfektionskraft beträgt aber nicht ganz das Doppelte.

Da die Fabrik einen 4—6-fachen Desinfektionswert der Karbolsäuretablets gegenüber der reinen Karbolsäure angibt, so wurde noch folgende Versuchsanordnung getroffen: Zu je 50 ccm einer 36-stündigen Staphylokokkenbouillon wurden zugegeben je 50 ccm einer 1-proz. Lösung von Karbolsäuretablets und 50 ccm einer 6-proz. Karbolsäurelösung. Die Prüfung auf Keimfreiheit erfolgte in Bouillon wie bisher, die Entnahmezeiten sind aus der Tabelle ersichtlich.

Zeit der Entnahme	Karbolsäuretablette 0,5 Proz.		Karbolsäure 3,0 Proz.	
	Röhrchen I	Röhrchen II	Röhrchen I	Röhrchen II
Nach 5 Minuten	+	+	—	—
" 10 "	+	+	—	—
" 15 "	+	+	—	—
" 20 "	+	+	—	—
" 25 "	+	+	—	—
" 30 "	+	+	—	—
" 35 "	+	+	—	—

Unter diesen Bedingungen versagte also die 0,5-proz. Lösung von Karbolsäuretablets vollkommen, während die 3-proz. Karbolsäurelösung schon nach 5 Minuten Keimfreiheit bewirkte. In einem Parallelversuch untersuchten wir gleichzeitig, wie die Desinfektionswirkung der gleichen

Desinfektionsmittel sich gestaltet, wenn wir zu 75 ccm Staphylokokkenbouillon nur 25 ccm der oben bereits genannten Lösungen der Desinfizientien gaben, so daß also Karbolsäuretabletten in 0,25 Proz., Karbolsäure in 1,5 Proz. auf Staphylokokken einwirkte. Unter diesen allerdings sehr ungünstig gewählten Bedingungen trat bei keinem der beiden Desinfektionsmittel in 35 Minuten Keimabtötung ein. Wir schließen aus diesen beiden Versuchen, daß der absolute Gehalt an Nährbouillon auch die Wirkung der reinen Karbolsäure beträchtlich herabsetzt, daß aber andererseits die 0,5-proz. Lösung von Karbolsäuretabletten dem 6-fachen an Karbolsäure, also einer 3-proz. Karbolsäurelösung, nicht gleichgesetzt werden darf.

Um endlich darüber Klarheit zu verschaffen, wie weit die Spaltung des Orthooxalsäurediphenylesters in Wasser vor sich geht und ob die erhöhte Desinfektionswirkung tatsächlich nur in einem Zusammenwirken der für sich frei in Lösung bestehenden Karbolsäure und Oxalsäure beruhe, stellten wir uns eine wässrige Lösung her, die den berechneten Gehalt an Oxalsäure und Karbolsäure entsprechend einer gleichprozentigen Karbolsäuretablettenlösung enthielt; gleichzeitig wurde noch die Desinfektionskraft der verwandten Oxalsäure und Karbolsäure unter den gleichen Versuchsbedingungen für sich allein festzustellen versucht. Wie früher wurden doppelt konzentrierte Lösungen der Desinfektionsmittel mit der gleichen Menge 24-stündiger Bakterienbouillon gemischt, um die entsprechend gewollten Konzentrationsgrade der Desinfizientien zu erhalten. Als Bakterium wurde Coli verwandt, weil dieses durch sein rasches Wachstum und frühzeitige intensive Trübung der Bouillonproberöhrchen besonders rasche und genaue Resultate liefert. Alles übrige ist aus der Tabelle ersichtlich.

Zeit der Entnahme	Oxalsäure 0,8 Proz.		Karbolsäure 1,2 Proz.		Oxalsäure 0,4 } Karbolsäure 0,6 } 1 Proz.	
	Röhrchen I	Röhrchen II	Röhrchen I	Röhrchen II	Röhrchen I	Röhrchen II
Nach 10 Minuten	+	+	+	+	+	+
" 25 "	+	+	+	—	+	+
" 45 "	+	+	—	—	—	—
" 70 "	+	+	—	—	—	—
" 100 "	+	+	—	—	—	—
" 135 "	—	—	—	—	—	—

Zeit der Entnahme	Karbolsäuretablette 1 Proz.		Oxalsäure 1,6 Proz.	
	Röhrchen I	Röhrchen II	Röhrchen I	Röhrchen II
Nach 10 Minuten	—	—	+	+
" 25 "	—	—	+	+
" 45 "	—	—	—	—
" 70 "	—	—	—	—
" 100 "	—	—	—	—
" 135 "	—	—	—	—

Als Resultat ergibt sich folgendes: Die Karbolsäuretablettenlösung wirkt energischer keimtötend als eine gleichprozentige Kombination von Oxalsäure und Karbolsäure entsprechend der chemischen Zusammen-

setzung von Orthodiphenyloxalsäureester¹⁾. Oxalsäure allein entwickelt ebenfalls eine beträchtliche Desinfektionskraft, die der von Karbolsäure nicht viel nachsteht und die zweizeitige Kaliumpermanganat-Oxalsäure-desinfektion der Hände, wie sie in pathologischen Instituten vielfach angewandt wird, in einem günstigen Lichte erscheinen läßt.

In den bisherigen Versuchen war die entwicklungshemmende Wirkung der Desinfektionslösungen nach Möglichkeit ausgeschlossen. Da wir jeweils 0,5 ccm der auf Keimgehalt zu prüfenden Lösungen entnahmen und mit 9,5 ccm steriler Nährbouillon mischten, so erzielten wir in diesem ersten Proberöhrchen eine Verdünnung von 1:20. Von dieser Verdünnung wurden nach kräftigem Umschütteln wiederum 0,5 ccm entnommen und in einem zweiten Bouillonröhrchen nochmals verdünnt. Im ganzen erzielten wir also eine Verdünnung der entnommenen Proben 1:400. Berücksichtigt man nun noch, daß schon in der Desinfektionslösung das Desinfiziens beträchtlich verdünnt ist (bei den Karbolsäuretablettten ca. 1:100), so ergibt sich, daß in den Bouillonröhrchen Verdünnungen der Desinfektionsmittel zustande kommen, die praktisch eine Hemmungswirkung nicht mehr ausüben können.

Gleichwohl hat es für die Beurteilung eines Desinfektionsmittels Wert, gerade die Hemmungswirkung zu kennen, denn in praxi, z. B. bei der Desinfektion der Hände oder von Wunden kommt häufig die Wirkung im wesentlichen auf eine Hemmung der Bakterien hinaus. Nun hat Rapp, Centralbl. f. Bakt. etc. Bd. XIII. p. 126, eine Methode für Prüfung von Desinfektionsmitteln angegeben, die nach unserer Ansicht viel häufiger Anwendung finden sollte.

Diese Methode steht der Entwicklungshemmung am nächsten und unterscheidet sich von derselben dadurch, daß eine große Anzahl von Keimen von Anfang an vorhanden ist und daß der Zusatz von Antiseptikum in kürzeren Zwischenpausen so oft wiederholt wird, bis Abtötung erzielt ist. Die Größe der Verdünnung und die Anzahl der Zusätze bis zur völligen Abtötung ergibt den Unterschied zwischen den Werten der verschiedenen Desinfektionsmittel. Der Gang der Untersuchung ist folgender: Zu einem gleichen Quantum (10 ccm) einer durch Watte filtrierten Bakterienbouillonkultur gibt man das Desinfektionsmittel, so daß eine starke Verdünnung desselben resultiert. Man wählt dabei für Sublimat eine Verdünnung im Verhältnis 1:50000, für die anderen Desinfizienten eine stärkere Konzentration, die jedoch zu der Verdünnung von Sublimat in einem bestimmten Verhältnis steht, je nachdem das betreffende Präparat in stärkerer oder schwächerer Lösung zur Anwendung empfohlen wird, z. B. Sublimat wird gewöhnlich 1:1000 angewandt; lasse ich es nun in einer Konzentration 1:50000 wirken, so habe ich die in der Praxis übliche Konzentration um das 50-fache verdünnt. Will ich die Desinfektionskraft dieser Lösung nun mit Lysol, das für gewöhnlich 2-proz. benützt wird, vergleichen, so muß ich auch diese Lysollösung 50-fach verdünnt, d. h. 1:2500 anwenden. Die Bouillonkulturen, denen das Desinfiziens zugesetzt wird, werden bei 37° C im Brutschrank aufbewahrt, alle 12 Stunden wird eine große Platinöse voll zur Probe entnommen und auf einem Schrägagarröhrchen zur Kultur ausgestrichen. Jedesmal sofort nach der Probeentnahme wird dann der

1) Bei einer Wiederholung des Versuches ergab sich gleiche Desinfektionskraft: Karbolsäuretablette 1 Proz. = Oxalsäure 0,4 + Karbolsäure 0,6.

Bouillonkultur die gleiche Menge des gleichen Desinfiziens wiederum zugesetzt und so fortgefahren, bis die Agarprobekulturen keimfrei bleiben. Die ganze Anordnung des Versuches beruht auf der von Rapp gemachten Erfahrung, daß in einer Bouillonkultur, der man eine so kleine Menge Desinfiziens zugesetzt hat, daß nur ein Teil der Keime abgetötet wird, nach etwa 12 Stunden die kleinste Keimzahl erreicht ist, worauf dann wieder eine Vermehrung der überlebenden Keime einsetzt.

Gewöhnlich angewandte Konzentration	Desinfektionsmittel	Verdünnungsgrad des Desinfektionsmittels in der Bouillonkultur	Von der in Reihe I angegebenen Konzentration wurden jeweils zugesetzt	Probeentnahme nach Stunden											
				12	24	36	48	60	72	84	96	108	120	132	144
2,0-proz.	Lysol	1:2500	0,2 ccm	+	+	+	+	+	+	—	—	—	—	—	—
2,0- „	Karbolsäure	1:2500	0,2 „	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—
0,5- „	Karbolsäuretabletten	1:10000	0,2 „	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1,0- „	Formalin	1:5000	0,2 „	+	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—

Durch ein alle 12 Stunden wiederholtes Zufügen der gleichen Menge des gleichen Desinfiziens wird dann ganz allmählich die Keimzahl immer mehr herabgesetzt, indem jeweils die überlebenden Keime immer schwerer geschädigt werden, bis endlich auch die widerstandsfähigsten Formen absterben: Es ist gewissermaßen eine Hemmung, die bis zur Abtötung durchgeführt ist. In unserem Falle (siehe Tabelle) hat die 0,5-proz. Lösung der Karbolsäuretabletten einen sichtbaren Einfluß auf die Keimzahl der Bouillonkultur in 144 Stunden überhaupt nicht auszuüben vermocht, während Formalin 1-proz. in 48 Stunden, Lysol 2-proz. in 84 Stunden und Karbolsäure 2-proz. in 132 Stunden alle Keime abtötete. Dieser Ausfall darf uns nicht wundernehmen, denn schon aus den vorhergehenden Versuchen mußten wir schließen, daß die hohe Desinfektionskraft, welche die Karbolsäuretabletten in wässriger Lösung entwickeln, bei Verwendung von Bouillon als Lösungsmittel eine sehr beträchtliche Einbuße erleidet, und zwar eine verhältnismäßig stärkere als die anderen zum Vergleiche herangezogenen Desinfizientien. Auch Schneider, Croner und Schindler kamen bei ihren Versuchen zu dem gleichen Resultat. Bei der Versuchsanordnung nach Rapp, bei der in viel Bouillon eine möglichst kleine Menge des Desinfiziens auf Bakterien wirken soll, mußte diese Eigenschaft der Karbolsäuretabletten notgedrungen besonders hervortreten.

Desinfektionsversuche an sporenhaltigem Material wurden von uns nicht durchgeführt, denn sie gestatten nach unserer Ansicht keine sichereren Schlußfolgerungen bezüglich des Wertes eines Desinfektionsmittels für die ärztliche Praxis, als der lege artis durchgeführte Versuch an irgendwelchen anderen vegetativen Keimformen. Sporen stellen bei Desinfektionsversuchen lediglich ein widerstandsfähigeres Testobjekt dar und wenn nun tatsächlich auch, wie bereits die früheren Untersucher es festgestellt haben, die Karbolsäuretablettenlösung hier weit mehr leistet als die Karbolsäurelösung, so wird aus diesem Grunde wohl kein Chirurg

sich auf die sporentötende Kraft des Diphenylorthooxalsäureesters verlassen dürfen oder die Vernichtung von Bacillensporen in der Technik (etwa Abtötung der Milzbrandsporen) eine Aenderung erfahren.

Ueberblicken wir das Gesamtergebnis unserer Untersuchungen über die Wirkung der Karbolsäuretablettchen, so müssen wir dieses neue Desinfektionsmittel als eine erfreuliche Bereicherung unseres Arzneischatzes bezeichnen. Wenn auch unter den praktisch in Frage kommenden Bedingungen die Desinfektionskraft des Orthodiphenyloxalsäureesters nicht so groß ist, wie ursprünglich von der Fabrik angegeben wurde, so ist sie doch der Karbolsäure wesentlich überlegen. Nimmt man hinzu, daß aus den Karbolsäuretablettchen hergestellte wirksame Lösungen (0,75 bis 1,0 Proz. notwendig) einen absolut geringeren Gehalt an giftigen Substanzen aufweisen als gleich wirksame Karbolsäurelösungen, berücksichtigt man endlich die handliche und haltbare Dosierung, die geringe Aetzwirkung und Geruchlosigkeit, so kann man wohl erwarten, daß sich die Karbolsäuretablettchen in die Desinfektionspraxis gut einführen werden.

Nachdruck verboten.

Die Methämoglobinbildung in bluthaltigen Nährböden durch Streptokokken.

[Aus der Univers.-Augenklinik zu Greifswald (Direktor: Prof. Römer).]

Von Dr. Wilhelm Grüter, Assistenzarzt.

Mit einer Spektraltafel.

Die Differentialdiagnose zwischen *Streptococcus lanceolatus* und *longus* (Schottmüller) bereitet manchmal, wenn die charakteristischen Merkmale nicht deutlich hervortreten, große Schwierigkeiten. Man hat darum versucht, durch Anwendung bestimmter Nährböden die Unterscheidung herbeizuführen. Die bekannteste dieser Methoden ist wohl diejenige Schottmüllers, die Streptokokken nach ihrem Wachstum auf Blutnährboden einzuteilen.

Folgende 4 Arten unterscheidet Schottmüller (1):

1) *Streptococcus longus*. Weiße oder graue Kolonien auf Blutagar, die stets von einem hellen Hof umgeben sind.

2) *Streptococcus viridans*. Graue oder schwarzgrüne Kolonie. Die Bildung eines hellen Hofes hängt von dem Blutgehalt des Agars ab. Bei einem Mengenverhältnis von 2:5 ist im allgemeinen kein Hof sichtbar. Wenn aber nur einige Tropfen Blut zum Agar zugesetzt werden, so läßt sich makroskopisch ein feiner heller Hof nachweisen.

3) *Streptococcus mucosus*. Bildet einen schleimig grüngrauen Belag auf Agar. Im Innern gelegene Kolonien erscheinen dunkelgrün.

4) *Streptococcus lanceolatus*. Entwicklung eines üppigen dunkelgrünen Belages.

Züchtete Sch. die Streptokokken in Blutbouillon, die er durch Zusatz einiger Tropfen Blut zur Bouillon herstellte, so traten folgende Veränderungen auf:

Bei Brutschranktemperatur wurde durch den *Streptococcus longus* die hellrote Farbe der Bouillon allmählich in Burgunderrot umgewandelt.

Durch *Streptococcus viridans* wird die Blutbouillon nach etwa 24 Stunden grün gefärbt.

Die gleiche Erscheinung ruft der *Streptococcus mucosus* hervor und ebenso der *Streptococcus lanceolatus*.

Die Frage, ob sich die Einteilung Schottmüllers aufrecht erhalten läßt, ist wiederholt erörtert und die Richtigkeit dieser Einteilung vielfach in Zweifel gezogen worden; dagegen hat die Frage, welche Ursache die Farbenänderung des Nährbodens hat, bisher wenig Beachtung gefunden.

Nur zwei Arbeiten liegen darüber vor. Rieke (2) hat das Verhalten des *Streptococcus longus* in Blutbouillon eingehender studiert und ist zu dem Ergebnis gekommen, daß auch der *Streptococcus longus* die Fähigkeit der Methämoglobinbildung besitzt. Zugleich konstatierte er, daß die Braunfärbung durch Umwandlung des Oxyhämoglobins in Methämoglobin hervorgerufen wird. Aus seinen Untersuchungen schließt Rieke, daß die Methämoglobinbildung an eine spezifische Lebenstätigkeit der Streptokokken gebunden sei.

Boxer (3) bestätigte die Methämoglobinbildung durch *Streptococcus longus*.

Weiterhin finden sich in der Literatur einzelne Angaben über die Verfärbung bluthaltiger Nährböden durch Streptokokken. Meist hat man beim Studium der Hämolyse die eigenartige Braunfärbung der Lösungen beobachtet und hat sie kurzerhand auf die gleiche Ursache wie die Hämolyse zurückgeführt. So Centanni (4) wie ich aus einem Zitat von Pflüger im Kolle-Wassermann ersah. Auch Kraus und Clairmont (5) sprechen sich in diesem Sinne aus.

Eine Beobachtung Römers, daß bei Zusatz von einem Tropfen frischen Hammelblutes zu einer üppig gewachsenen Pneumokokkenbouillonkultur die anfänglich rotgefärbte Bouillon schnell eine intensiv braune Farbe annimmt, gab mir, nachdem ich spektroskopisch Methämoglobinbildung festgestellt hatte, Veranlassung, diesen eigenartigen Vorgang näher zu untersuchen. Vielleicht ließe sich mit Hilfe dieser Variation der Schottmüllerschen Methode die Unterscheidung des *Streptococcus lanceolatus* (*Pneumococcus*) von den übrigen Streptokokkenarten erleichtern und beschleunigen. Nun rief ein Vergleich meiner Befunde mit den bisherigen Angaben über diesen Gegenstand mancherlei Bedenken hervor, und ich wurde dadurch angeregt, bei den 4 Schottmüllerschen Streptokokkenarten die Ursachen und Bedingungen der Methämoglobinbildung und ihren differentialdiagnostischen Wert zu untersuchen.

Ich kam zu folgendem Ergebnis:

1) Die allgemeinen Bedingungen für die Methämoglobinbildung sind die gleichen, wie sie für chemische Körper bereits durch physiologische und pharmakologische Untersuchungen festgestellt sind.

2) Allen Streptokokkenarten kommt die Fähigkeit zu, Oxyhämoglobin in Methämoglobin umzusetzen.

3) Die Methämoglobinbildung ist nicht an eine spezifische Lebenstätigkeit der Streptokokken gebunden.

4) Hämolyse und Methämoglobinbildung sind zwei voneinander unabhängige Prozesse.

5) Es ist unmöglich, allein durch Züchtung auf bluthaltigen Nährböden alle Schottmüllerschen Streptokokkenarten zu unterscheiden.

Die allgemeinen Bedingungen der Methämoglobinbildung.

Rieke begründet seine Angabe, daß die Braunfärbung der Streptokokkenblutbouillon als Methämoglobinbildung aufzufassen sei, damit, daß er spektroskopisch die Absorptionsstreifen des neutralen Methämoglobins feststellen konnte. Hierbei ist aber zu bedenken, daß Hämatin in saurer Lösung das gleiche Spektrum wie saures oder neutrales Methämoglobin hat, und es bedarf darum, um jedem Zweifel zu begegnen, noch des untrüglichen Nachweises, daß kein Hämatin vorliegt.

Das neutrale Methämoglobin hat folgendes Spektrum: Einen im Rot gelegenen, sich scharf abhebenden Streifen und zwei im Grün an der gleichen Stelle, wo die Oxyhämoglobinstreifen auftreten. Diese beiden Streifen heben sich im Gegensatz zu den Oxyhämoglobinstreifen nur sehr schwach von dem Untergrund ab und sind schmaler. Der vierte Streifen des MHB, der sich durch Abdunkelung des Blau geltend macht, tritt wenig hervor.

In zweierlei Weise läßt sich der Nachweis für MHB führen:

1) Methämoglobin in alkalischer Lösung ist dunkelrot und hat ein charakteristisches Spektrum: 2 Absorptionsstreifen, welche den 2 Oxyhämoglobinstreifen ähnlich sind, von diesen aber sich dadurch unterscheiden, daß der dem Blau benachbarte Streifen stärker ist, als der im Anfang des Grün liegende. Neben dem letzteren und mit ihm wie durch einen Schatten verbunden liegt ein dritter, schwacher Streifen nahe bei der „D“-Linie [nach Hammarsten (6)].

2) Setzen wir nach Alkalisierung der braungefärbten Bouillon Ammonsulfid zu, so tritt das breite Absorptionsband des reduzierten Hämoglobins im Grün auf, wenn Methämoglobin vorhanden ist, während Hämatin das charakteristische Spektrum des alkalischen Hämochromogens zeigt.

Beide Proben fielen bei braungefärbter Streptokokkenbouillon positiv für MHB aus.

Da auch in intakten Blutkörperchen durch Streptokokkenbouillon MHB gebildet wird, so gab mir dieser Umstand noch einen dritten Beweis an die Hand. Wird nämlich nur ein Teil des Oxyhämoglobins im Blutkörperchen in MHB umgesetzt, so vermag die Blutzelle selbständig das gebildete MHB in HB zurückzuverwandeln.

Als Beweis dafür folgende Beobachtung: Setzte ich zu 3 ccm einer 6 Tage alten Bouillonkultur von *Streptococcus longus* einen Kapillartropfen (etwa 0,04 ccm) Hammelblut, so war nach einigen Stunden in der rotbraun gefärbten Flüssigkeit spektroskopisch MHB neben OHB nachzuweisen. — Die MHB-Bildung war in intakten Blutkörperchen aufgetreten, denn 6 Tage alte Bouillonkultur von *Streptococcus longus* hat, was ich hier bereits erwähnen muß, seine hämolytischen Eigenschaften eingebüßt. — Nach ca. 24 Stunden sah die Bouillon wieder rot aus und hatte HB-Spektrum. Bei mehrfacher Wiederholung mit anderen Streptokokkenstämmen erzielte ich das gleiche Resultat. Machte ich den gleichen Versuch mit alten, nicht mehr wachstumsfähigen Bouillonkulturen von *Viridans* und *Lanceolatus*, so färbte sich die Mischung in wenigen Minuten braun. Eine Rückbildung des entstandenen MHB trat nicht mehr ein. Nun verdünnte ich die Kulturen von *Str. lanceolatus* stufenweise mit steriler Bouillon und setzte zu 3 ccm Gesamt-

flüssigkeit einen Kapillartropfen Hammelblut. In den Versuchsröhrchen, die 0,6—0,9 ccm Bakterienbouillon enthielten, hatte sich nach 4-stündigem Brutschrankaufenthalt Rotbraunfärbung eingestellt. Es war also nur ein Teil des OHB in MHB umgesetzt worden. Nach weiterem 20-stündigen Aufenthalt im Brutschrank sah die Mischung wieder dunkelrot aus.

Spektroskopisch war nur HB, das durch das Aufschütteln schnell in OHB übergang, nachzuweisen. Genau so lagen die Verhältnisse beim Viridans; nur daß hier wegen des üppigeren Wachstums geringere Mengen genügten, um eine Rotbraunfärbung zustande zu bringen. Das Ergebnis dieser Versuche steht in Einklang mit den Beobachtungen Hayems (7) und Filipowskis (8), Hayem hat im Jahre 1885 bei seinen Untersuchungen über die MHB-Bildung durch Amylnitrit den Nachweis geführt, daß sich nach einiger Zeit das MHB in reduziertes HB verwandelt. 10 Jahre später beobachtete Filipowski den gleichen Vorgang bei Cholerakulturen, die in bluthaltigen Nährböden gezüchtet waren.

Bevor ich auf die Besprechung der Bedingungen für die MHB-Bildung eingehe, habe ich noch einige technische Bemerkungen vorausschicken.

Zur Anstellung der MHB-Probe verwandte ich kleine Reagenzgläser von $\frac{1}{2}$ ccm Durchmesser. Zu 3 ccm einer 24-stündigen Bouillonkultur füge ich einen Kapillartropfen (ca. 0,04 ccm) serumfreien Blutes. Bei intensiver MHB-Bildung, die sich durch Braunfärbung der Flüssigkeit kenntlich macht, bedarf es keines weiteren spektroskopischen Nachweises. Jedoch kommt es bei einer großen Zahl von Versuchen nur zu einer schwachen MHB-Bildung, und es ist in diesem Falle schwer, an der Dunkelrot- oder unsicheren Rotbraunfärbung der Lösung zu entscheiden, ob MHB gebildet worden ist. Hier kann allein die spektroskopische Untersuchung den Ausschlag geben.

Von den 4 Absorptionsstreifen des MHB ist nach den Untersuchungen von Araki (9) und Dittrich (10) allein der im Rot gelegene Streifen charakteristisch, während die beiden im Grün gelegenen Streifen auf Spuren von noch vorhandenem OHB zurückzuführen sind. Bei den weiteren Untersuchungen habe ich mich darum nur nach dem im Rot gelegenen Streifen gerichtet. Seine Erkennung habe ich mir beim Vorhandensein sehr kleiner MHB-Mengen dadurch erleichtert, daß ich das Reagenzglas nicht vertikal, sondern möglichst horizontal vor das Spektroskop einspannte. So ließ sich bequem bei Verwendung von 3 ccm Flüssigkeit eine fast 5 cm dicke Flüssigkeitsschicht herstellen. Dadurch traten MHB-Mengen, die in $\frac{1}{2}$ cm dicker Schicht nicht zu erkennen waren, sehr deutlich zutage.

Nach den von physiologischer und pharmakologischer Seite gemachten Erfahrungen war man anfänglich zu der Ueberzeugung gekommen, daß bei der MHB-Bildung sich oxydative oder reduktive Prozesse abspielen. Die als MHB-Bildner sich erweisenden chemischen Körper waren nämlich teils Oxydationsmittel, beispielsweise Ozon, teils Reduktionsmittel, wie Pyrogallol, Brenzkatechin. Nun fanden sich aber noch Substanzen, die ihrer chemischen Natur nach als indifferent angesehen werden mußten, wie Anilinsalze Nitrate, Nitrite. Dadurch war die bis dahin geltende Anschauung erschüttert, und bald wurde auch von Kulz (zitiert bei Hammarsten) der experimentelle Nachweis erbracht, daß OHB und MHB den gleichen Sauerstoffgehalt haben, nur daß „O“ im MHB fester

an das HB-Molekül gebunden ist als im OHB. Die Frage, ob auch bei Abwesenheit von „O“, OHB in MHB übergeführt werden könne, wurde von Dittrich (8) in bejahendem Sinne entschieden.

Daß das für chemische Körper geltende Gesetz auch seine Anwendung bei der MHB-Bildung durch Bakterien findet, läßt sich aus folgender Beobachtung erkennen:

Wird der flüssige Agar beispielsweise mit *Viridans* beimpft, so entwickeln sich braune Kolonien nicht nur an der Oberfläche, sondern auch in der Tiefe des Agars. Diese Braunfärbung der Kolonien ist, wie die spektroskopische Untersuchung ergibt, durch MHB bedingt. Somit ist für diese Versuche die Frage nach dem Einfluß des Luftsaauerstoffes auf die MHB-Bildung erledigt.

Dagegen kommt eine Anzahl anderer Faktoren für die MHB-Bildung durch Streptokokken in Betracht:

- 1) Temperatur,
- 2) Versuchsdauer,
- 3) Quantität des MHB-Bildners,
- 4) physikalische Beschaffenheit des Blutes,
- 5) Blutart.

Ad 1) Stelle ich eine Versuchsröhre, z. B. *Pneumokokkenbouillon* mit Hammelblutzusatz, in den Eisschrank, so tritt keine MHB-Bildung ein. Nehme ich die gleiche Röhre, die tagelang unverändert im Eisschrank gestanden hat und lasse sie sich auf etwa 20° erwärmen, so tritt in wenigen Minuten Braunfärbung ein. Im Brutschrank geht dieser Prozeß 2—3mal so schnell wie bei Zimmertemperatur vor sich. Bei noch höherer Temperatur tritt in entsprechend kürzerer Zeit die Umsetzung in MHB ein. Jedoch empfiehlt es sich nicht, über 36° bei den Versuchen hinauszugehen, da bei steigender Temperatur die Neigung, von selbst in MHB überzugehen, eine um so größere ist.

Ad 2) Bei 24-stündiger Bouillonkultur von *Streptococcus lanceolatus*, *viridans* und *mucosus* vollzieht sich die MHB-Bildung schon bei Zimmertemperatur vielfach in einem Zeitraum von 3—15 Minuten. Bei der gleichalterigen Kultur von *Streptococcus longus* dauert es dagegen bei Zimmertemperatur etwa 8—12 Stunden, bis es zu einer deutlichen MHB-Bildung kommt. Ja bei manchen Versuchsbedingungen, wenn die bakterienfreien Lösungen nur minimale Mengen von MHB-bildenden Substanzen enthalten, bedarf es eines 15 bis 20-stündigen Aufenthaltes im Brutschrank, ehe sich in ca. 5 cm dicker Flüssigkeitsschicht im Spektrum MHB nachweisen läßt. Proben, die nach 24 Stunden keine MHB-Bildung zeigten, blieben auch in den nächsten Tagen unverändert. — Es könnte mir an dieser Stelle der Einwurf gemacht werden, daß Proben, die erst nach etwa 20 Stunden positiv ausfallen, einen zweifelhaften Wert hätten, da möglicherweise bereits von selbst in dieser Zeit eine Umsetzung von OHB in MHB stattfände. Dieser Einwurf wird durch Kontrollversuche entkräftet. Füge ich zu einer 0.85-proz. sterilen Kochsalzlösung oder zu sterilem Wasser Hammelblut, so ist auch nach mehrtägigem Aufenthalt der Versuchsröhrchen im Brutschrank keine spektroskopische Veränderung nachzuweisen.

Ad 3) Die MHB-Bildung vollzieht sich nach quantitativen Verhältnissen. Setze ich z. B. zu 3 ccm einer 24-stündigen *Pneumokokkenbouillonkultur* 1 Kapillartropfen Hammelblut, so färbt sich in wenigen Minuten die Flüssigkeit braun. Bei Zusatz von 2 Tropfen Blut tritt

etwas später völlige Braunfärbung ein. Bei Zusatz von 3 Tropfen behält dagegen die Bouillon eine Rotbraunfärbung bei. Es sind dann im Spektrum die OHB- und MHB-Streifen vorhanden. Nehme ich weiterhin 3 ccm einer 24-stündigen Bouillonkultur von *Streptococcus longus*, füge 1 Kapillartropfen Hammelblut hinzu und lasse die Mischung ruhig stehen, so bleibt schließlich unter der braunen Schicht eine den Boden des Reagenzglases bedeckende hellrote Schicht, die OHB-Spektrum hat, unverändert bestehen.

Ich habe versucht, für eine größere Zahl von Streptokokkenstämmen diejenige Menge einer 24 Stunden alten Bouillonkultur festzustellen, die notwendig ist, um in 0,04 ccm Hammelblut eine eben spektroskopisch nachweisbare Menge von MHB zu bilden. Die Verdünnungen der Originalbouillonkultur wurden in der Weise hergestellt, daß von 3 ccm an abwärts zu fallenden Mengen Bakterienbouillon entsprechende Mengen steriler Bouillon zugesetzt wurden, so daß stets 3 ccm Versuchsflüssigkeit vorhanden waren. Nur bei einem *Streptococcus longus* war ich genötigt, über 3 ccm hinauszugehen, da diese Menge von Bakterienbouillon nicht hinreichend war, um nach 4 Stunden eine eben nachweisbare MHB-Bildung hervorzurufen. Ich habe die Versuchsdauer deswegen auf 4 Stunden festgesetzt, weil bei zu kurzer Versuchszeit sich minimale Mengen an MHB-bildender Substanz dem Nachweis entzogen hätten. Andererseits ist mit dieser Versuchsanordnung eine Fehlerquelle geschaffen; denn durch den 4-stündigen Aufenthalt der Röhrchen im Brutschrank wird durch erneutes Bakterienwachstum die MHBbildende Substanz vermehrt. Da jedoch dieser Fehler sich in allen Versuchen geltend macht, lassen sich doch Vergleichswerte, auf die es hier ankommt, gewinnen.

	<i>Streptococcus lanceolatus</i>	Str. Viridans	Str. Longus
Von einer 24-stündigen Bouillonkultur	0,6—0,1	0,3—0,04	3,5—1,5

Die Differenzen sind zum Teil auf die Eigenart des betreffenden Stammes, zum Teil auf verschieden starkes Wachstum zurückzuführen; so erklären sich wohl im wesentlichen die Unterschiede zwischen dem sehr empfindlichen *Str. lanceolatus* und dem üppig wachsenden *Viridans*. Jedoch kann unmöglich der ausgesprochene Gegensatz zwischen der MHB-bildenden Fähigkeit des *Str. lanceolatus* und *viridans* auf der einen Seite, des *Str. longus* auf der anderen Seite nur auf Wachstumsschwankungen zurückgeführt werden.

Ad 4) Gelöster Blutfarbstoff wird schneller in MHB verwandelt als der an das Blutkörperchen gebundene. Beispiel: Streptokokkenextrakte sind vielfach nicht imstande, das OHB intakter Blutkörperchen zu verändern, dagegen wird freier OHB durch sie ganz oder teilweise in MHB umgesetzt. Es ist dies ohne weiteres dadurch verständlich, daß das Ektoplasma des Blutkörperchens dem Eindringen einer schädlichen Substanz einen Widerstand entgegensetzt. Der Widerstand ist z. B. gegenüber chemischen Blutgiften ein sehr großer. Ferricyankalium, das einen starken MHB-Bildner darstellt, vermag im Reagensglas nur in gelöstem Blutfarbstoff, nicht in intakten Blutkörperchen MHB zu bilden.

Ad 5) Die Intensität der MHB-Bildung hängt auch von der zur Verwendung kommenden Blutart ab. Am schnellsten verändert sich

Hammelblut. Ihm nahe steht Kälberblut. Alle anderen Blutarten folgen in geringerem oder größerem Abstände, wie die folgende Tabelle zeigt, die die Durchschnittszeit bei Prüfung aller Pneumokokkenstämme angibt. Es wurde zu 3 ccm 24-stündiger Kultur 0,04 Hammelblut zugesetzt.

Zimmer- temperatur	Hammel	Kalb	Rind	Mensch	Kaninchen	Pferd, Katze	Schwein
Minuten	3	5	9	12	15	30	35

Ich glaube, daß der verschiedenen große Widerstand des Ektoplasmas gegen das Eindringen der MHB-bildenden Substanzen diese Unterschiede erklärt, daß weniger der wechselnde Gehalt des OHB an C, N, S usw. die Ursache der zeitlichen Differenzen ist.

An dieser Stelle möchte ich noch auf die Frage eingehen, ob es notwendig ist, mit serumfreien Blutkörperchen die Versuche anzustellen. Nach der Angabe von Falk (11) soll nämlich Serumglobulin MHB bildende Eigenschaften besitzen. Ich habe daraufhin Pferde- und Hammelserum auf die genannte Fähigkeit hin untersucht, aber es trat weder bei Zusatz von intakten Hammelblutkörperchen noch von freiem Hammelblutfarbstoff im Laufe von 48 Stunden bei Brutschranktemperatur irgendeine spektroskopisch nachweisbare Veränderung auf. Ich konnte auch bei Vergleichsversuchen, wenn einmal serumfreies und dann serumhaltiges Blut verwandt wurde, keine zeitliche Differenz im Eintritt der MHB-Bildung feststellen, vorausgesetzt, daß die Versuchsflüssigkeiten öfter umgeschüttelt wurden. Nur wenn bei länger dauernden Versuchen die Reagenzgläser ruhig stehen blieben, machte sich der Serumgehalt des Blutes störend bemerkbar. Es trat in letzterem Falle eine viel stärkere Verklebung der am Boden liegenden Blutkörperchen ein; eine Wirkung der Hämagglutinine des Serums. Dadurch wurden die MHBbildenden Stoffe verhindert, in die Blutkörperchen einzudringen. Zur Erläuterung bringe ich folgenden Versuch: Blutbouillon, die einmal durch Zusatz von serumhaltigem Blut, dann von serumfreiem Blut zur sterilen Bouillon hergestellt ist, wird mit nicht hämolytischen Pneumokokken beimpft. Nach ca. 15 Stunden liegt bei reichlicher Bakterienentwicklung in der Röhre mit serumfreiem Blutzusatz ein braunes Blutkoagulum am Boden. Das Blut zeigt gleich nach dem Aufschütteln MHB-Spektrum. In der Röhre mit serumhaltigem Blutzusatz liegt ein dunkelrotes Gerinnsel. Erst nach einigen Minuten, spätestens nach $\frac{1}{4}$ Stunde nimmt das aufgeschüttelte Blut eine braune Farbe an. Spektroskopisch war zunächst nur OHB, dann MHB nachzuweisen.

Nimmt die Bouillon Anteil an der MHB-Bildung?

Da eine sterile Rinderbouillon ein Gemisch mehrerer Stoffe darstellt, so muß man notwendigerweise erst noch die Einzelbestandteile, soweit sie zugänglich sind, untersuchen. — Die Pneumokokken werden im hiesigen Institut in einer nach Angabe Römers hergestellten, leicht alkalischen Bouillon, der Pferdeserum im Verhältnis von 0,5:10,0 zugesetzt ist, gezüchtet. Dieser Serumzusatz hat, wie ich zeigte, keinen Einfluß auf die MHB-Bildung. Dennoch habe ich bei den folgenden Versuchen, um jeglichem Bedenken zu begegnen, nur solche Pneumokokkenkulturen verwandt, die in einfacher Rinderbouillon gezüchtet waren.

Die Untersuchungen Falks hatten weiterhin ergeben, daß Kochsalz schon in $1\frac{1}{2}$ -proz. Lösung MHB-bildend wirkt. Für unsere Experimente

käme die NaCl-Wirkung, da die Bouillon nur $\frac{1}{2}$ Proz. davon enthält, nicht in Betracht. Wie ich mich überzeugen konnte, wurde weder durch eine $\frac{1}{2}$ -proz., noch durch eine 0,85-proz. NaCl-Lösung, die bei späteren Versuchen verwandt wird, irgendwelche Veränderung in gelöstem Blutfarbstoff hervorgerufen. Auch durch den 1-proz. Peptongehalt der Bouillon wird keine Umsetzung in OHB herbeigeführt.

Während also die Bouillonzusätze an sich keinen Einfluß auf Blutfarbstoff haben, ließ sich mit aller Bestimmtheit nachweisen, daß die gebrauchsfertige sterile Rinderbouillon nach etwa 15—20 Stunden bei 36° in freiem Blutfarbstoff eine schwache MHB-Bildung erzeugt. Ich bin der Ansicht, daß durch die summierende Wirkung der Fleischextraktivstoffe und des Kochsalzes diese Umsetzung im Blutfarbstoff zustande kommt. Es könnte dagegen folgender Einwand gemacht werden: Aus den erwähnten Untersuchungen Falks wissen wir, daß eine Kochsalzlösung erst von einer bestimmten Konzentration ($\frac{1}{2}$ Proz.) an, die Fähigkeit besitzt, OHB in MHB umzusetzen. Könnte nicht die MHB-bildende Fähigkeit von Extraktivstoffen + $\frac{1}{2}$ -proz. Kochsalzlösung in gleicher Weise darauf beruhen, daß durch das Vermischen dieser Substanzen eine einer $\frac{1}{2}$ -proz. Kochsalzlösung entsprechende Salzkonzentration herbeigeführt wird? Zur Entscheidung dieser Frage ist es nötig, die Salzkonzentration einer gebrauchsfertigen Rinderbouillon zu bestimmen.

Ich habe zu diesem Zweck den osmotischen Druck der Rinderbouillon gegenüber Hammelblutkörperchen festgestellt. Aus einem Vergleich mit dem osmotischen Druck einer bekannten Kochsalzlösung läßt sich der Salzgehalt der Bouillon genau bestimmen. Die Einzelheiten dieser Methode sind bei Hamburger (Osmotischer Druck und Ionentheorie, Wiesbaden, Bergmann) angegeben. — Ich kam zu dem Resultat, daß die gebrauchsfertige Bouillon einen Salzgehalt von 0,786 Proz. besitzt. Es wurde schon erwähnt, daß eine 0,85-proz. NaCl-Lösung keine MHB bildenden Eigenschaften gegenüber Blutfarbstoff besitzt. Es ist also, da die Bouillon einen noch geringeren Salzgehalt hat, ausgeschlossen, daß die MHB-bildende Fähigkeit einer gebrauchsfertigen Rinderbouillon auf eine erhöhte Salzkonzentration zurückzuführen ist.

MHB-Bildung durch *Streptococcus lanceolatus* (Pneumococcus).

Da der Vergleich mehrerer Blutarten ergeben hatte, daß das Hammelblut sich am besten für den Nachweis MHB-bildender Substanzen eignet, so sind alle nachfolgenden Untersuchungen fast ausschließlich mit Hammelblut angestellt worden.

Im ganzen sind 22 Pneumokokkenstämme zur Untersuchung herangezogen. Davon besaß die Mehrzahl schwach hämolytische Eigenschaften. Für weiße Mäuse waren alle hochpathogen. Auf Hammelblutagarplatten hatten sich nach ca. 15 Stunden dunkelbraune Kolonien in üppigster Weise entwickelt. Die Braunfärbung war, wie die spektroskopische Untersuchung der Platten ergab, durch MHB-Bildung bedingt. Wurde Hammelblutbouillon mit Pneumokokken beimpft, so war auch hier nach etwa 15 Stunden intensive Braunfärbung, gleichfalls durch MHB bedingt, zu konstatieren.

Bei den meisten Stämmen trat bei Zimmertemperatur auf Zusatz von einem Kapillartropfen Hammelblutes zu 3 ccm 24-stündiger Bouillonkultur intensive Braunfärbung ein, bei einigen erst nach $\frac{1}{4}$ — $\frac{1}{2}$ -stündigem

Aufenthalt der Versuchsröhrchen im Brutschrank. Zur Entscheidung der Frage, ob die MHB-Bildung an die Lebenstätigkeit des *Lanceolatus* gebunden ist, untersuchte ich eine etwa 4 Wochen alte Bouillonkultur, die, unbeachtet, täglich dem Sonnenlicht ausgesetzt gewesen war. — Uebertragungsversuche mit dieser Kultur fielen völlig negativ aus. — Auch hier trat bei Blutzusatz in wenigen Minuten bei Zimmertemperatur Dunkelbraunfärbung auf. Wiederholte Versuche mit abgestorbenen Kulturen — davon war die älteste 35 Tage alt — lieferten das gleiche Resultat. Tötete ich dagegen eine 24-stündige Bouillonkultur ab, indem ich sie 5 Minuten lang in kochendes Wasser stellte, oder erhitzte ich eine halbe Stunde auf 65°, so war in keiner Versuchsröhre mehr eine Spur MHB auf Blutzusatz nachzuweisen. Nur wenn die Bouillon eben bis zum Kochen erhitzt war, trat noch, jedoch wesentlich langsamer als bei nicht erhitzten Kulturen, eine Braunfärbung ein. Dabei machte ich die weitere Beobachtung, daß, falls es sich um einen hämolytischen Stamm handelte, absolut keine Hämolyse in den Röhrchen mit erhitzten Kulturen auftrat.

Aus diesen Versuchen ergibt sich also dreierlei:

1) Die MHB-Bildung wird auch durch abgestorbene Pneumokokken hervorgerufen.

2) MHB-Bildung und Hämolyse sind zwei getrennte Vorgänge.

3) Durch kurzes Erhitzen wird die MHB bildende Substanz geschädigt, durch längeres Kochen zerstört.

Um nun die Natur des MHB-Bildners noch genauer aufzuklären, bin ich in folgender Weise vorgegangen: Durch 5-stündiges Zentrifugieren trennte ich bei einer 24-stündigen Bouillonkultur Bakterien und Bouillon. Nach abermaligem Zentrifugieren der Bouillon und des Bakteriensatzes wurde letzterem sterile Bouillon in entsprechender Menge zugesetzt und gleich seine MHB bildende Fähigkeit untersucht. Unter dieser Versuchsbedingung trat auf Blutzusatz bei der Mehrzahl der Stämme in wenigen Minuten, bei anderen erst nach $\frac{1}{2}$ -stündigem Aufenthalt im Brutschrank eine starke MHB-Bildung, kenntlich an völliger Braunfärbung, ein. Die abgeheberte Bouillon färbte sich nach 1 bis 3 Stunden rotbraun bis braun.

Die gleichen Versuche mit 4 Wochen alter Kultur hatten folgendes Ergebnis: I. Bakteriensatz + sterile Bouillon + Hammelblut gab keine MHB-Bildung. Versuchsdauer: 20 Stunden bei 36°. Wurde gelöster Blutfarbstoff zugesetzt, so trat nach 10—15 Stunden schwache MHB-Bildung ein. Die Mischung war rotbraun. II. Abgeheberte zentrifugierte Bouillon + Blut färbte sich in wenigen Minuten bei Zimmertemperatur braun. Spektroskopisch: Nur MHB-Streifen. Durch Untersuchung von 1—15 Tage alten Bouillonkulturen ließ sich feststellen, daß bei einzelnen Stämmen vom 3. Tage an, bei anderen vom 5. und 7. Tage an in der bakterienfreien abzentrifugierten Bouillon auf Blutzusatz eine schnelle Braunfärbung eintritt. Daraus ergibt sich folgendes:

Ob die nach dem Zentrifugieren einer 24-stündigen Bouillonkultur in der Bouillon nachweisbaren MHB bildenden Substanzen als Sekretionsprodukte der Zelle aufzufassen sind, läßt sich nicht mit Bestimmtheit entscheiden. Sicher ist, daß sich noch im Bakterienleibe MHB bildende Substanzen finden, die mit fortschreitendem Zerfall der Bakterien in zunehmender Stärke in der

Bouillon auftreten. Weiterhin gehen diese Stoffe, wie ich mich überzeugen konnte, nicht durch das Berkefeld-Filter. Nur nach wochenlangem Zerfall läßt sich im Filtrat eine Spur MHB bildender Substanz nachweisen.

Da bekanntlich sterile Rinderbouillon in geringem Grade OHB in MHB umzubilden vermag, so ist es, um sich ein wirkliches Bild von der MHB bildenden Fähigkeit der Pneumokokken zu verschaffen, notwendig, diesen Vorgang in völlig neutralen Lösungen zu untersuchen.

Die Frage, ob die Anwesenheit der Bouillon zum Zustandekommen der MHB-Bildung durch Pneumokokken notwendig ist, wird durch folgende Versuche mit bouillonfreien Nährböden entschieden:

1. Ich verrieb auf der Oberfläche einer Blutagarplatte, die aus Agar, Pepton und 0,85-proz. Kochsalzlösung und Hammelblut im Verhältnis von 1 : 10 hergestellt war, einige Oesen 24 Stunden alter Bouillonkultur. Nach 12—15 Stunden hatten sich braune Kolonien entwickelt. Braunfärbung und Wachstum dieser Kolonien war weniger intensiv als auf Platten mit Bouillonzusatz.

2. Zu 10 ccm steriler 0,85-proz. NaCl-Lösung fügte ich 0,1 ccm Blutfarbstoff. Diesen Nährboden beimpfte ich mit 2 Oesen 24-stündiger Bouillonkultur eines Stammes, der ausgesprochene MHB bildende Fähigkeiten hatte. Nach 8 Stunden war bei 36° unter schwacher Bakterienentwicklung die Lösung braun gefärbt. Nahm ich an Stelle des gelösten Blutfarbstoffes intakte Blutkörperchen, so fiel der Versuch negativ aus. Die MHB-Bildung durch Pneumokokken ist also nicht an die Mitwirkung von Bouillon oder an deren Nährsubstanzen gebunden.

Dagegen wird ihre Intensität durch Bouillon wesentlich verstärkt, wie aus einem Vergleich folgender Parallelversuche hervorgeht.

In Versuch I wurden die abzentrifugierten Bakterien einer 24-stündigen Bouillonkultur mit steriler Bouillon, in Versuch II mit 0,85-proz. NaCl-Lösung, in Versuch III mit H₂O aufgeschüttelt. Nun wurde mit diesen Mischungen sofort die MHB-Probe bei Brutschranktemperatur angestellt. In Versuch I war nach 15 Minuten die Flüssigkeit braun, in Versuch II nach ca. 3 Stunden rotbraun und blieb weiterhin unverändert; in Versuch III war das Resultat fast das gleiche wie in II. Die Rotbraunfärbung trat etwas früher auf.

Bei Wiederholung mit anderen Stämmen trat in Versuch I die Braunfärbung nach 30—60 Minuten ein, in Versuch II nach 8—15 Stunden, in Versuch III durchschnittlich einige Stunden früher als in II. Daß die Bakterien in II und III noch ihre volle MHB bildende Kraft besaßen, ging aus gleichzeitigen Kontrollen mit den gleichen Bakterien-sedimenten hervor, in dem der Satz, mit steriler Bouillon vermengt, auf Blutzusatz schnelle Braunfärbung hervorrief.

In Versuch III ließ sich der Beweis noch bestimmter dadurch erbringen, daß der Bakteriensatz von dem rotbraun gefärbten Wasser durch abermaliges Zentrifugieren getrennt, auf Zusatz von steriler Bouillon und von Blutkörperchen die Mischung braun färbte.

Um den Uebergang von MHB bildender Substanz in die umgebende Flüssigkeit noch schärfer, als es in der Bakterienbouillon möglich ist, zum Ausdruck zu bringen, habe ich das Sediment einer 24 Stunden alten Bouillonkultur in Versuch I 1/2 Stunde lang, im 2. Versuch 8 Tage lang mit einer NaCl-Lösung bzw. mit H₂O in Berührung gelassen. In

einem 3. Versuch benutzte ich eine 16 Tage alte Mischung. Durch 2mal 5-stündiges Zentrifugieren wurde das neutrale Lösungsmittel von dem Sediment getrennt. Das Sediment schüttelte ich wieder mit der entsprechenden Menge steriler NaCl-Lösung bzw. H₂O auf.

In Versuch I (1/2, Stunde alte Mischung) war das Ergebnis folgendes:

- a) 1. Kochsalzhaltiger Bakteriensatz + Hammelblut gab nach einigen Stunden Rotbraunfärbung.
2. Wasserhaltiger Bakteriensatz + Hammelblut fast das gleiche Resultat. Die Rotbraunfärbung trat etwa eine Stunde früher auf.
- b) 1. Kochsalzhaltiger Auszug + Hammelblut = 0.
2. Wässriger Auszug + Hammelblut = 0.

Versuch II (8 Tage alte Mischung).

- a) 1. Kochsalzhaltiger Bakteriensatz + Hammelblut = 0.
Kochsalzhaltiger Bakteriensatz + gelöster Blutfarbstoff = Rotbraun (8–10 Stunden).
2. Wasserhaltiger Bakteriensatz + Hammelblut = Rotbraun (8 bis 10 Stunden).
- b) 1. Die völlig klare, eiweißfreie, neutral reagierende kochsalzhaltige Extraktionsflüssigkeit war für weiße Mäuse toxisch. 1 ccm einer Maus injiziert, tötete sie nach etwa 15 Stunden. Bakteriologische und spektroskopische Untersuchung des Herzblutes verlief negativ.
Kochsalzhaltige Extraktionsflüssigkeit + Hammelblut = 0.
Kochsalzhaltige Extraktionsflüssigkeit + gelöster Blutfarbstoff = Braun (5–8 Stunden).
2. Wässriger Auszug hatte fast das gleiche Ergebnis wie b) 1.
Kurzes Aufkochen sowohl des NaCl-haltigen als auch des wässrigen Auszuges schädigte die MHB bildende Substanz, aber zerstörte sie nicht. Der NaCl-Auszug hatte, wenn er von hämolytischen Stämmen herrührte auch hämolytische Eigenschaften. Nach 7–10 Stunden war bei 36° völlige Hämolyse eingetreten. Nach Filtrieren durch Berkefeld-Kerzen hatten die NaCl-haltigen und die wässrigen Auszüge keine MHB bildende Fähigkeiten mehr.

Versuch III (16 Tage alte Mischung).

- a) 1. Kochsalzhaltiger Bakteriensatz + gelöster Blutfarbstoff = Rotbraun (ca. 10 Stunden).
2. Wasserhaltiger Bakteriensatz + gelöster Blutfarbstoff = Rotbraun (ca. 10 Stunden).
- b) 1. Kochsalzhaltiger Auszug + Hammelblut = Braun (4–6 Stunden).
2. Wässriger Auszug + Hammelblut = Braun (4–6 Stunden).

Der kochsalzhaltige und wässrige Auszug waren gleichfalls eiweißfrei und steril. Nach dem Filtrieren trat nach 15–20 Stunden eine sehr schwache MHB-Bildung auf Zusatz von OHB ein. Bei anderen Stämmen fiel nach dem Filtrieren die MHB-Probe gänzlich negativ aus. Diese Versuche mit bouillonfreien Mischungen bestätigen, daß die MHB-Bildung nicht die Anwesenheit der Bouillon zur Voraussetzung hat, daß aber die Intensität der MHB-Bildung wesentlich von der Bouillon beeinflusst wird. Noch schärfer als in den früheren Versuchen kommt das eigenartige Verhalten der in der Bakterienzelle vorgebildeten MHB bildenden Substanz zur Geltung: Während in jüngeren Kulturen das Sediment den Hauptanteil an der MHB-Bildung hat, tritt mit zunehmendem Alter der Kultur die fragliche Substanz in immer stärkerem Maße in der Extraktionsflüssigkeit auf.

Streptococcus viridans.

Boxer, der in einer umfangreichen Untersuchung Schottmüllers Angaben nachprüfte, fand unter den von Mandelabstrichen gezüchteten Streptokokken keinen, der die für den Viridans angegebenen Merkmale gehabt hätte. Auch Lehmann (12) hält den Viridans für

sehr selten, da er ihn nur einmal in einer eitrigen Angina fand. In der letzten Zeit hat man jedoch mehrfach diese Streptokokkenart gefunden. Z. B. haben Lüdke und Polano (13) ihn wiederholt bei Anginen nachgewiesen. Bei der Untersuchung von entzündeten und nicht entzündeten Tonsillen habe ich 4 mal einen *Streptococcus* gezüchtet, den ich aus folgenden Gründen als *Str. viridans* sprechen mußte: 1) Er wuchs auf Agar als zarte, grauweiße Kolonie. 2) Sehr üppig unter starker Satzbildung in Rinderbouillon. 3) Es entwickelten sich auf Hammelblutagar (1:10) schwarzbraune, gelegentlich grün schimmernde Kolonien. Hofbildung war nur bei einem Stamme zu erkennen. Dieser besaß für weiße Mäuse geringe Pathogenität. In Dosen von 1 ccm 24-stündiger Bouillonkultur intraperitoneal eingespritzt, starb eine der Mäuse nach 24 Stunden. Im Herzblut waren Kettenkokken nachzuweisen. Die anderen 3 Stämme erwiesen sich in 1 ccm Dosis als avirulent. — Hammelblutbouillon war nach 15 Stunden, wenn wiederholt die Bouillon aufgeschüttelt wurde, braun gefärbt. Sowohl die braunen und grünen Agarkolonien als auch die braune Bouillon hatten MHB-Spektrum. 4) Im mikroskopischen Präparat waren nie Lanzettformen nachzuweisen.

Die nachfolgenden Untersuchungen beim *Str. viridans* sind nach dem gleichem Schema, wie es beim *Str. lanceolatus* angewandt wurde, angestellt. Da das Verhalten des MHB-Bildners stets das gleiche, wie beim *Str. lanceolatus* war, so habe ich auf eine Wiederholung der Details verzichtet. Wegen des üppigeren Wachstums des *Str. viridans* fielen die Proben deutlicher als beim *Lanceolatus* aus.

Im einzelnen gab die Untersuchung von Bouillonkulturen folgendes Bild:

24-stündige Bouillonkultur färbte sich auf Zusatz von Hammelblut in 3—15 Minuten bei Zimmertemperatur tief braun. Wurden die Kulturen nach Blutzusatz auf Eis gesetzt, so trat keine Aenderung ein, aber nach kurzem Aufenthalt im Brutschrank fiel die Probe prompt positiv aus. Eine 30 Tage alte, völlig sterile Kultur nahm gleichfalls auf Blutzusatz in wenigen Minuten bei Zimmertemperatur eine braune Farbe an. Durch halbstündiges Erhitzen auf 65°, ebenso durch Kochen, wurde die MHB-bildende Substanz zerstört, dagegen durch ganz kurzes Aufkochen nur in seiner Wirkung abgeschwächt.

Wurden in einer 24-stündigen Bouillonkultur wiederum Bakterien von der Bouillon getrennt, so riefen die mit steriler Bouillon aufgeschüttelten Bakterien schnelle und intensive MHB-Bildung auf Blutzusatz bei Zimmertemperatur hervor, die abgeheberte Bouillon färbte sich erst nach mehrstündigem Brutschrankaufenthalt schwach braun. Gelegentlich führte bereits vom 2. Tag ab, bei anderen Stämmen vom 3.—6. Tage ab die abpipettierte und zentrifugierte Bouillon in intakten Blutkörperchen eine intensive MHB-Bildung herbei. — Zeitdauer: Einige Minuten bis zu einer halben Stunde. Der Bakteriensatz gab in diesen Fällen stets ein weit schwächeres Resultat.

Nach dem Filtrieren durch Berkefeldkerzen trat nur bei Kulturen, die älter als 6 Tage waren, eine schwache Rotbraunfärbung im Filtrat auf. Auf bouillonfreien Blutagarplatten wuchsen braune Kolonien. Wurde dem Sediment einer 24-stündigen Kultur 0,85-proz. NaCl-Lösung zugesetzt, so trat erst nach mehreren Stunden Braunfärbung dieser Mischung bei Zusatz von Blutkörperchen ein.

7 Tage alte, Kochsalzhaltige Bakterienaufschwemmungen verhielten sich bei der MHB-Probe folgendermaßen.

a) Sediment + freies OHB = Rotbraunfärbung nach einigen Stunden bei 36°.

b) Die klaren eiweißfreien, neutralen und sterilen NaCl-Auszüge färbten sich auf Zusatz von intakten Blutkörperchen verhältnismäßig schnell braun. Bei einem Stamm hatte sich die Umsetzung nach einer Stunde bei 36° vollzogen, bei einem zweiten dauerte es etwa 2 Stunden. Auch noch nach ganz kurzem Aufkochen trat MHB-Bildung in intakten Blutkörperchen ein. Keine der Extraktionsflüssigkeiten hatte eine Spur hämolytischer Eigenschaft. Nach dem Filtrieren der Auszüge fand sich nach mehrstündigem Brütschrankaufenthalt auf Zusatz von OHB eine geringe Umsetzung in MHB ein. Es verläuft also die MHB-Bildung in der gleichen Weise und unter den gleichen Bedingungen, wie beim *Streptococcus lanceolatus*.

Streptococcus longus.

Die zur Untersuchung verwandten Stämme waren bei folgenden Erkrankungen gewonnen worden:

Tränensackblennorrhoe 1,
Ucl. corneae 2,
Fingerphlegmone 2,
Endometritis puerperalis 3. (Von der hiesigen Frauenklinik mir freundlichst überlassen.)

Alle Stämme wiesen auf Blutnährböden die für den *Str. longus* angegebenen Merkmale auf:

1) Auf Blutagar Entwicklung von grauen, von einem hellen Hof umgebenen Kolonien. 2) Bei Züchtung in Hammelblutbouillon zunächst Hämolyse, dann die zuerst von Rieke beobachtete Braunfärbung.

Zeitlich verlief letzterer Prozeß folgendermaßen:

Nach 8 Stunden ziehen bei ruhigem Stehen der Versuchsröhren Streifen lackfarbigen Blutes vom Boden her gegen die Oberfläche. Nach 12 Stunden zeigen sich 2 Schichten: Eine etwa die Hälfte der Flüssigkeit einnehmende burgunderrote Schicht, die das Spektrum von reduziertem Hämoglobin hat; darüber, scharf abgesetzt, eine schwach rotbraune Schicht. Wegen der feinen Verteilung des Farbstoffes ließ sich spektroskopisch nur dann MHB nachweisen, wenn ich abheberte und in 5 cm dicker Schicht untersuchte. Ließ ich die Kultur ruhig weiter stehen, so war nach etwa 22 Stunden eine deutliche Braunfärbung fast in der ganzen Flüssigkeit zu konstatieren; nur den Boden bedeckte eine schmale hellrote Blutschicht, die sich auch nach weiteren Tagen in der Farbe nicht mehr änderte. Bei manchen Stämmen konnte ich schon nach 15 Stunden völlige Braunfärbung nachweisen.

Um wieviel empfindlicher das Hammelblut gegenüber dem Menschenblut ist, sehen wir aus der zum Vergleich dienenden Angabe von Rieke. Danach trat bei Zusatz von Menschenblut zur Bouillon nach 12 Stunden Hämolyse, ein nach 24 Stunden war die ganze Flüssigkeit burgunderrot, nach 72 Stunden braunrot.

Stellte ich nun mit einer 24-stündigen Bouillonkultur in der bekannten Weise mit Hammelblut die MHB-Probe an und schüttelte dabei wiederholt die Mischung um, so machte ich bei einem der Puerpuralstreptokokken folgende Beobachtung:

Im Brütschrank nach 20 Minuten Beginn der Hämolyse. Nach 1/2 Stunde die Lösung rotbraun, nach 1 Stunde alles braun. Nicht bei

allen Stämmen trat die Hämolyse und die MHB-Bildung so schnell ein. Z. B. begann bei einem Phlegmonen-Streptococcus die Hämolyse nach $2\frac{1}{2}$ Stunden, spektroskopisch eben nachweisbare MHB-Bildung nach etwa 5 Stunden. Bei einem von einem Hornhautgeschwür gezüchteten Streptococcus war die Hämolyse erst nach 6 Stunden aufgetreten, weiterhin dauerte es noch 9 Stunden, bis eine Spur von Methämoglobin nachweisbar war und auch nach Tagen war der Prozeß nicht weitergegangen. Nach mehrmaligem Ueberzüchten verlor der Stamm seine hämolytischen Eigenschaften. MHB-Bildung trat nur noch spurenhafte nach 15 bis 20 Stunden auf.

Ließ ich die Versuchsröhrchen, ohne aufzuschütteln, stehen, so blieb, nachdem sich der größte Teil der Lösung braungefärbt hatte, eine den Boden bedeckende Schicht lackfarbigen Blutes bestehen. Nach 5-tägiger Beobachtung hatte die Schicht wohl an Höhe etwas abgenommen, im übrigen bestand aber das Spektrum des reduzierten HB. Wurde die Flüssigkeit dann wiederholt aufgeschüttelt, so ließ sich mit bloßem Auge allerdings nur die bisherige Braunfärbung feststellen, spektroskopisch war dagegen neben dem Absorptionsstreifen des MHB- der OHB-Streifen aufgetreten. Es findet also nicht in unbegrenzter Weise Umsetzung von OHB in MHB statt.

Bei Zimmertemperatur spielt sich der ganze Prozeß weit langsamer ab. Bei Verwendung des erstgenannten Puerperal-Streptococcus dauerte es 11 Stunden, bis die Hämolyse begann, 15 Stunden, ehe es zur erkennbaren MHB-Bildung kam. Im Eisschrank setzen alle Umbildungen im Blutkörperchem aus. Eine Schädigung trat jedoch bei dem Aufenthalt im Eisschrank nie ein. Nachdem die Röhrchen wieder kurze Zeit im Brutschrank gestanden, war ein Fortschreiten der geschilderten Phänomene zu erkennen.

Wir haben gesehen, daß bei der MHB-Probe bei einer 24-stündigen Bouillonkultur die Hämolyse vor der MHB-Bildung eintritt. Darf man nun aus dieser zeitlichen Folge beider Vorgänge ohne weiteres schließen, daß beide durch ein und dieselbe Ursache hervorgerufen werden, so daß der Bildung des MHB stets Hämolyse vorausgehen müsse? Die Beobachtungen bei Streptococcus lanceolatus legen uns schon die Vermutung nahe, daß sich zwei getrennte Prozesse abspielen. Tatsächlich läßt sich beim Str. longus in zweierlei Weise der Beweis für die Unabhängigkeit beider Vorgänge erbringen. 1) Durch ganz kurzes Aufkochen wird auch hier das Hämolysin zerstört, die MHB bildende Substanz ist zwar auch geschädigt, aber noch deutlich nachweisbar. Längeres Kochen und $\frac{1}{2}$ -stündliches Erhitzen auf 65° zerstört auch den MHB-Bildner. Dafür folgendes Beispiel: 3 ccm frischer Bouillonkultur des früher verwandten Puerperal-Streptococcus, die kurz aufgekocht wurden, färbten sich bei 36° nach $1\frac{1}{2}$ Stunden auf Zusatz intakter Hammelblutkörperchen rotbraun. MHB-Spektrum deutlich; keine Hämolyse. Bei Verwendung von Menschenblut das gleiche Ergebnis nach $2\frac{1}{2}$ Stunden.

Den zweiten Beweis brachte mir die Beobachtung, daß 6 Tage alte Bouillonkulturen keine hämolytischen Eigenschaften mehr besitzen, während die Fähigkeit, MHB zu bilden, noch ungeschwächt vorhanden ist. Besredka (14) ist bei seinen Untersuchungen über das Streptokokkenhämolysin fast zum gleichen Resultate gekommen. Er gibt an, daß 5 Tage alte Kulturen ihre hämolytischen Fähigkeiten eingebüßt hätten.

Aus der folgenden Tabelle läßt sich am besten das verschiedene Verhalten des Hämolytins und des MHB-Bildners erkennen. Verwandt wurde bei diesen Versuchen ein Phlegmonen-Streptococcus.

Alter	Hämolyse	MHB	Farbe
1—5 Tage	+ 2 Stunden	4 — 3 Stunden	rotbraun
6—16 "	—	$2\frac{1}{2}$ — $1\frac{3}{4}$ "	"
21—30 "	—	$\frac{1}{2}$ — $\frac{1}{4}$ "	braun

Es ist also nicht zweifelhaft, daß auch beim Streptococcus longus Hämolyse und MHB-Bildung voneinander unabhängige Vorgänge sind und weiterhin erhellt aus dieser Tabelle, daß die Umsetzung des OHB in MHB nicht an die spezifische Lebenstätigkeit der Streptokokken gebunden ist.

Rieke führt als Beweis für seine Behauptung, daß die Umwandlung von OHB in neutrales MHB eine Folge der physiologischen Funktionen der Streptokokken sei, folgende Experimente an:

1) Tötete er durch einstündiges Erhitzen auf 70° die Bouillonkulturen ab und setzte die abzentrifugierten Bakterienleiber einer sterilen Blutbouillon zu, so blieb diese unverändert.

2) Filtrierte er eine 24-stündige Bouillonkultur und setzte Blut zum Filtrat oder filtrierte er eine Kultur, die burgunderrot gefärbt war, so trat keine Hämolyse und keine Braunfärbung mehr auf.

3) Streptokokkenblutbouillon wurde, nachdem sie burgunderfarben geworden war, in den Eisschrank gesetzt. Die Färbung änderte sich nicht. Wurde dagegen das Versuchsglas in den Brutschrank gestellt, so färbte sich die Flüssigkeit im Verlaufe von 12 Stunden braun.

Meine Versuche haben mich, ohne daß mir Riekes Arbeit näher bekannt war, zum gleichen Resultat geführt. Daß daraus dennoch nicht der Schluß Riekes berechtigt ist, beweist der stets positive Ausfall der MHB-Probe mit abgestorbenen, nicht mit abgetöteten Kulturen. Der weiteren Behauptung Riekes, daß bei der Umsetzung des OHB in MHB das Verhältnis der Bakterien zur Blutmenge keine Rolle spiele, möchte ich meine im allgemeinen Teil gemachten Beobachtungen entgegenhalten, indem ich nachwies, daß ein bestimmtes Bakterienquantum dazu gehört, um eine gewisse Menge in einer bestimmten Zeit und bei gleichmäßiger Temperatur in MHB umzusetzen.

Die bisherigen Versuche mit Str. longus gaben eine völlige Uebereinstimmung mit den Erfahrungen, die wir beim Str. lanceolatus und viridans gemacht haben. Es gilt nur noch festzustellen, ob bei Ersatz der Bouillon durch neutrale Lösungen und bei getrennter Untersuchung von Sediment und Extraktionsflüssigkeit die Ergebnisse die gleichen sind.

Es wurde also durch zweimaliges Zentrifugieren einer 24 Stunden alten Bouillonkultur eines Streptococcus, der von einer Endometritis puerpuralis gewonnen war, die Bakterien von der Bouillon getrennt.

In Versuch I wurde Sediment mit der entsprechenden Menge steriler Bouillon, in Versuch II mit 0,85-proz. NaCl-Lösung gemischt. Auf Zusatz von Hammelblutkörperchen war in Versuch I und II nach $1\frac{1}{2}$ -stündigem Aufenthalt der Röhrchen im Brutschrank vollständige Hämolyse eingetreten. Nach ca. 5 Stunden war in Versuch I die

Mischung braun gefärbt, in II dauerte es fast 8 Stunden, bis es zu einer Rotbraunfärbung kam. Diese Färbung blieb dann bestehen.

In der abgeheberten Bouillon trat bei 36° nach etwa 3 Stunden völlige Hämolyse ein. Nach 6 Stunden war die Lösung schwach braun.

Wurden in Versuch I und II sterile Bouillon beziehungsweise 0,85-proz. NaCl-Lösung 1 Stunde lang mit dem Sediment gemischt, dann durch 6-stündiges Zentrifugieren wieder getrennt, so fand weder in der Bouillon noch in der NaCl-Lösung irgendeine Veränderung bei Zusatz von intakten Blutkörperchen oder gelöstem Blutfarbstoff statt.

Eine Wiederholung dieser Versuche mit einem 8 Tage alten Bakterien-Kochsalzgemisch, beziehungsweise einer 8 Tage alten Originalbouillonkultur gab folgendes Resultat:

In beiden Versuchen zeigte der Bakteriensatz gleiches Verhalten. Derjenige der Bouillonkultur, mit steriler Bouillon aufgeschüttelt und derjenige der kochsalzhaltigen Mischung mit 0,85-proz. NaCl-Lösung aufgeschüttelt, brachten auf Zusatz von gelöstem Blutfarbstoff bei 36° nach etwa 8 Stunden eine schwache MHB-Bildung zustande. Die Mischungen waren rotbraun gefärbt.

Wurde der abzentrifugierten Bouillon Blut zugesetzt, so trat nach 3 Stunden bei 36° Rotbraunfärbung ein. Der klare, sterile, eiweißfreie, neutral reagierende NaCl-Auszug nahm auf Zusatz von Blutfarbstoff nach 10—12-stündigem Aufenthalt im Brütschrauk eine rotbraune Farbe an.

Wurde die kochsalzhaltige Extraktionsflüssigkeit filtriert, so fiel die MHB-Probe völlig negativ aus. Es geht aus diesen Versuchen hervor, daß auch bei *Str. longus* in 24 Stunden alter Kultur die MHB bildenden Substanzen noch im wesentlichen im Bakteriensediment vorhanden sind, daß aber mit zunehmendem Alter der Kultur diese Substanzen in die umgebende Flüssigkeit übergehen. Darauf ist sicherlich die schnellere und intensivere Wirkung alter Kulturen zurückzuführen. Noch deutlicher als bei den beiden schon untersuchten Streptokokkenarten tritt hier die Unabhängigkeit der Hämolyse von der MHB-Bildung hervor.

Streptococcus mucosus.

Ich kann mich hier kurz fassen. Mir stand nur ein Stamm zur Verfügung, den Herr Professor Wittmack, Jena, bei einer Warzenfortsatzeiterung gewonnen und mir freundlicherweise zur Verfügung gestellt hatte. In Blutbouillon gezüchtet, färbt sich nach 15 Stunden die Bouillon braun, auf Blutagar entwickelten sich schleimige braune Kolonien. Die spektroskopische Untersuchung beider Nährböden ergab, daß die Braunfärbung auf MHB-Bildung zurückzuführen war.

Setzte ich zu 3 ccm einer 24 Stunden alten Bouillonkultur einen Kapillartropfen Hammelblut, so war in wenigen Minuten die ganze Flüssigkeit bei Zimmertemperatur braun gefärbt. Weitere Untersuchungen habe ich über diese Streptokokken nicht anstellen können. Nach den bisherigen Erfahrungen mit den übrigen Gliedern der Streptokokkenfamilie zweifle ich nicht daran, daß auch beim *Mucosus* die Bedingungen der MHB-Bildung die gleichen sind.

Werfen wir nochmals einen Blick auf das Gesamtergebnis der bisherigen Untersuchung und vergleichen MHB-Bildung mit Hämolyse, so läßt sich folgendes sagen:

1) Alle Streptokokken besitzen die Fähigkeit, OHB in MHB umzusetzen, dagegen hat nur ein Teil hämolytische Eigenschaften.

2) Bei Zusatz steriler Bouillon wird die MHB-Bildung verstärkt, die Hämolyse nicht.

3) Die MHB bildende Substanz besitzt gegen Hitze eine größere Widerstandsfähigkeit als das Hämolsin.

4) Bei Zerfall der Bakterien geht das Hämolsin in einigen Tagen zugrunde, während der MHB-Bildner noch wochenlang nachweisbar ist.

Gemeinsam ist beiden Vorgängen, daß sie dem Grade nach recht verschieden sein können. Dieser graduelle Unterschied in der MHB-Bildung zeigt sich sowohl innerhalb der einzelnen Streptokokkenart als auch ganz besonders zwischen dem *Streptococcus longus* auf der einen Seite und dem *Str. lanceolatus*, *viridans* und *mucosus* auf der andern Seite, so daß wir den *Streptococcus longus* als schwächeren MHB-Bildner von den übrigen trennen können. Eigentümlich ist das antagonistische Verhalten des Hämolsins. Beim starken MHB-Bildner wenig oder gar keine hämolytische Eigenschaft, beim schwächeren MHB-Bildner ausgesprochene hämolytische Fähigkeit.

Dieser Gegensatz zwischen Hämolyse und MHB-Bildung gibt uns auch eine Erklärung für das scheinbar verschiedene Verhalten des *Str. longus* auf festen und flüssigen Nährböden.

Bei der Hofbildung um die Kolonien von *Str. longus* auf Blutagarplatten hat man festgestellt, daß in dem hellen Bezirk nur noch Blutschatten, kein Blutfarbstoff mehr vorhanden sind. Auf zweierlei Weise könnte dieses erklärt werden. Es könnte sowohl das durch Hämolsin gelöste Oxyhämoglobin als gutes Nährmittel von der Zelle angezogen und verarbeitet worden sein, als auch durch eine Art Fermentwirkung des Hämolsins der Blutfarbstoff in eine andere Form umgewandelt sein¹⁾. Welche Auffassung richtig ist, ist für unsere Betrachtung nebensächlich. Wichtig ist nur, daß in der nächsten Umgebung der Zelle durch Wirkung des Hämolsins kein Blutfarbstoff mehr vorhanden ist. Nun wissen wir aus unsern Versuchen, daß das Hämolsin beim *Str. longus* sehr schnell und intensiv wirkt, der MHB-Bildner sich in größerer Intensität erst mehrere Stunden nach völliger Hämolyse bemerkbar macht. Wenn aber der um die Kolonie liegende Blutfarbstoff zu dieser Zeit bereits völlig verschwunden ist, so fehlt dem MHB-Bildner das Reagens, um seine Anwesenheit bemerkbar zu machen.

Ich muß hier noch auf ein zweites besonders auf dem Blutagar auftretendes Phänomen eingehen, das ist die gelegentliche Grünfärbung der Kolonien von *Str. lanceolatus* und *viridans*. Liegt hier etwas für die betreffenden Streptokokkenarten Charakteristisches vor, wie es Schottmüller annimmt oder liegt der Grünfärbung eine optische Erscheinung zugrunde, eine Vermutung, die schon von Boxer ausgesprochen worden ist?

1) Mir fiel bei beiden Streptokokkenarten auf, daß die Grünfärbung bei ein und demselben Stamm durchaus nicht regelmäßig auftrat, sondern daß nur unter bestimmten Bedingungen die Kulturen eine grüne Farbe

1) Nach den Untersuchungen von Zangenmeister (Dtsche med. Wochenschr. 1900. No. 10 u. 11) soll es sich bei der Hofbildung um einen reinen Diffusionsprozeß handeln, durch die Hämolyse aus den roten Blutkörperchen frei gemachten Blutfarbstoffes handeln.

hatten — auch diese grünen Kolonien hatten reines MHB-Spektrum — nämlich dann, wenn bei Blutzusatz von 1:10 die Agarplatte möglichst dünn gegossen und mäßige Mengen Material auf die Oberfläche geimpft worden waren. Auf einer dicken Blutagarschicht bildete der gleiche Stamm stets braune Kolonien.

Beim *Viridans* trat allerdings die Grünfärbung deutlicher hervor als beim *Lanceolatus*. Das liegt sicherlich daran, daß beim *Lanceolatus* das in MHB umgewandelte OHB einen schokoladenbraunen Ton hat, während bei *Viridans* sich eine mehr gelbbraune Verfärbung einstellt.

2) Hatte ich einen hämolytischen *Lanceolatus* auf eine mäßig dicke Agarplatte reichlich geimpft, so waren die Kolonien zunächst braun. Nach 1—2 Tagen hatte dann dort, wo der Agar infolge der Hämolyse durchsichtiger wurde, die braune Kolonie einen grün schimmern den Rand.

Diese Beobachtungen beweisen, daß es sich bei der Grünfärbung der Kolonien nur um ein optisches Phänomen handeln kann.

Inwieweit läßt sich nach diesen Erfahrungen der Blutnährboden zur Differentialdiagnose der Streptokokken verwenden?

Es ist nicht zu bezweifeln, daß sich die Streptokokken nach ihrem morphologischen und biologischen Verhalten in 4 Arten unterscheiden lassen; nur ist es nicht möglich, allein mit Blutnährböden diese Trennung durchzuführen. Auf Blutagar lassen sich der *Streptococcus longus* und der *mucosus* mit Sicherheit von den andern differenzieren, während auf dem gleichen Nährboden *Viridans* und *Lanceolatus* keine konstanten Unterscheidungsmerkmale aufweisen. In Blutbouillon wird die Unterscheidung des *Viridans*, *Lanceolatus* und *Mucosus* eher erschwert als erleichtert, da das für den *Mucosus* charakteristische schleimige Wachstum in der Bouillon nicht zu erkennen ist.

Das von Boxer empfohlene Vogessche Verfahren (15) zur Differenzierung der Streptokokken, das darin besteht, daß Blut dem kochenden Agar zugesetzt wird, wodurch ein rotbrauner Nährboden entsteht, gestattet ebenfalls nicht, den *Str. lanceolatus* von dem *Viridans* zu trennen. Denn beide färben bei reichlicher Uebertragung den Nährboden gelb, bei geringem Oberflächenwachstum grün.

Es liegt nahe zu fragen, ob auch noch andere Bakterien dieses eigentümliche Verhalten gegen Blutnährböden zeigen. Ich habe die im Bindehautsack vorkommenden Staphylokokken, Xerose- und Diphtheriebacillen daraufhin untersucht. Eine Veränderung des Nährbodens durch diese Keime trat nicht ein. Nur wäre zu berichten, daß der *Staphylococcus* schneller den Sauerstoff des Oxyhämoglobins verbraucht als die andern Keime und daß die Blutbouillon sich dadurch rotviolett färbt. Von Filipowski ist außer den genannten Bakterien noch der *Pyocyaneus*, Milzbrand und der *Cholera* bacillus untersucht worden. Letzterer erwies sich als starker MHB-Bildner. Demnach kann die MHB-Bildung nicht als eine charakteristische Eigenschaft allein der Streptokokkenfamilie angesehen werden.

Läßt sich nun die in vitro erzeugte MHB-Bildung im Tierexperiment zustande bringen?

Vom Kali chloricum ist es uns bekannt, daß sich durch Einführung großer Dosen eine Vergiftung erzielen läßt, die sich besonders durch intensive MHB-Bildung im Blutkörperchen äußert.

Weiterhin hat Dittrich durch Verfütterung großer Antifebrinmengen eine starke MHB-Bildung im kreisenden Blute erzeugt.

Es wäre also vielleicht die Möglichkeit nicht ausgeschlossen, daß auch durch Ueberschwemmung des Blutes mit Streptokokken eine MHB-Bildung im Blutkörperchen zustande kommen könnte.

Ich habe bei zahlreichen weißen Mäusen, die an akutester Pneumokokkensepsis nach 12—15 Stunden eingingen, nie im Herzblut durch spektroskopische Untersuchung MHB feststellen können.

Weiterhin injizierte ich einer jungen Katze 25 ccm einer 24 Stunden alter Pneumokokkenkultur intraperitoneal. Es traten schwere Krankheitserscheinungen auf. Das Blut zeigte niemals MHB-Spektrum.

Schließlich habe ich einem mittelschweren Kaninchen 60 ccm einer 24-stündigen Bouillonkultur von *Str. viridans* in die Ohrvene gespritzt. Während der nächsten Stunden untersuchte ich in $\frac{1}{2}$ -stündlichen Abständen das Blut. Stets war reines OHB-Spektrum vorhanden.

	B	C	D	E	F	G
1						
2						
3						
4						

1 Oxyhämoglobin.

2 Hämoglobin.

3 Methämoglobin in alkalischer Lösung.

4 Methämoglobin in neutraler oder saurer Lösung.

Wie ist dieser negative Ausfall der Tierversuche zu erklären?

Die Hauptursache liegt sicherlich darin, daß die eingespritzten Bakteriodosen nicht groß genug gewesen waren. Denn aus der im allgemeinen Teil gemachten Tabelle ersieht man, daß im Höchstfall 0,04 ccm Bouillonkultur imstande ist, im 0,04 ccm Hammelblut eine eben nachweisbare Menge von MHB nach 4 Stunden bei 36° zu erzeugen. Hierbei ist aber zu bedenken, daß die Bouillon einen wesentlich begünstigenden Einfluß bei der MHB-Bildung hat und daß Kaninchenblut etwa fünfmal schwächer als Hammelblut wirkt. Berücksichtigen wir allein den letzteren Umstand, so wären, wenn wir die Blutmenge des Kaninchens auf ca. 100 gr setzen, mehrere Liter Bouillonkultur nötig, um im Gesamtblut in einigen Stunden eine eben erkennbare MHB-Bildung zu erzeugen. Weiterhin käme noch in Betracht, daß das Blutkörperchen die Fähigkeit besitzt, wenn ein Teil seines Blutfarbstoffes in MHB umgewandelt ist, dieses MHB wieder in OHB umzuwandeln. Sollte aber der ganze Blutfarbstoff des Blutkörperchens in MHB umgewandelt worden sein, so wird sehr schnell das nicht mehr lebensfähige Blut-

17*

körperchen aus der Blutbahn entfernt, wie es die Untersuchungen von Dittrich ergeben haben.

Aus allen diesen Gründen ergibt sich, daß auch im menschlichen Organismus, selbst bei der schwersten Streptokokkensepsis, es unmöglich zu einer nachweisbaren MHB-Bildung kommen kann und so ist die von Maschke (16) aufgeworfene Frage, ob allein durch Krankheitsprozesse, nicht durch künstliche Gifteinfuhr sich unter Umständen MHB im Körper bilden könne, im Fall einer Streptokokkenerkrankung des Blutes dahin zu beantworten, daß eine minimale vorübergehende MHB-Bildung möglich, eine für uns erkennbare dagegen ausgeschlossen ist.

Ausgegangen waren meine Untersuchungen von der Beobachtung Römers, daß in einer 24-stündigen Bouillonkultur von *Str. lanceolatus* auf Zusatz von Hammelblut schnelle Braunfärbung eintritt. Ist durch diese Modifikation des Schottmüllerschen Verfahrens eine vollkommenere Methode zur Differenzierung der Streptokokken entstanden? Nein! Gewiß läßt sich mit Römers Modifikation schnell der *Streptococcus longus* vom *Streptococcus lanceolatus* bzw. *viridans* unterscheiden; eine Trennung der beiden letzteren ist dagegen ebensowenig wie mit der Schottmüllerschen Methode möglich.

Herrn Professor Römer bin ich für die Anregung und sein freundliches Interesse bei der Anfertigung der Arbeit zu Dank verpflichtet. Ebenso möchte ich Herrn Professor Bleibtreu für seine liebenswürdige Unterstützung meinen herzlichen Dank aussprechen.

Nachtrag.

Die in der Anmerkung auf p. 257 bereits zitierte Arbeit Zangenmeisters: „Die Hämolyse der Streptokokken“ veranlaßt mich, noch im besonderen auf die Frage einzugehen, ob die Methämoglobinbildung der Streptokokken von dem Säuregehalt der Kulturen abhängig ist. Nach Zangenmeisters Ansicht wird die Methämoglobinbildung durch Alkalisierung der Streptokokkenbouillon verhindert.

Ich habe mich gleich zu Beginn meiner Untersuchungen mit diesem Gegenstande beschäftigt, habe es aber unterlassen, ausdrücklich darauf hinzuweisen, da ich im Laufe der Untersuchung zu der Ueberzeugung gelangte, daß die MHB-Bildung durch andere Faktoren als durch Säurewirkung zustande kommt. Ich fand, daß die Methämoglobinbildung bei mäßigem Gehalt an Säure oder Alkali eintritt; allerdings ging die Umsetzung bei saurer Reaktion schneller von statten. Wurde der Streptokokkenbouillon viel Alkali oder viel Säure zugesetzt, so kam es nicht zur Methämoglobinbildung.

Gegen Zangenmeisters Ansicht möchte ich weiterhin anführen, daß die mit einer 0,85-proz. Kochsalzlösung hergestellten Auszüge aus Bakterienleibern eine absolut neutrale Reaktion besaßen und dennoch eine einwandfreie MHB-bildende Fähigkeit hatten. Ebenso trat auf Zusatz von Blut zu einem Gemisch von sedimentierten Bakterien und steriler, deutlich alkalisch reagierender Bouillon prompt Methämoglobinbildung ein.

Wäre die Säurebildung das ausschlaggebende Moment für die Methämoglobinbildung, so müßten doch auch alle übrigen säurebildenden Bakterien, wenn sie in bluthaltigen Nährböden gezüchtet werden, das OHB in MHB umsetzen; so z. B. der *Staphylococcus albus* und

aureus, der Diphtheriebacillus. In Wirklichkeit liegen aber nach den bisherigen Untersuchungen die Verhältnisse so, daß bis jetzt nur beim Cholerabacillus und bei der Streptokokkengruppe Methämoglobinbildung nachgewiesen worden ist.

Literatur.

- 1) Schottmüller, Münch. med. Wochenschr. 1903. Nr. 20 u. 21.
- 2) Rieke, Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Bd. XXXVI. p. 321.
- 3) Boxer, Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Bd. XL. p. 591.
- 4) Pribram, Kolle-Wassermann. Ergänzungsheft I. p. 330.
- 5) Kraus und Clairmont, Wiener kl. Wochenschr. 1900 1901.
- 6) Hammersten, Lehrbuch der physiolog. Chemie, 4. Aufl. Wiesbaden, (Bergmann).
- 7) Hagen, Comptes rend. de l'académie d. sciences. T. III. 1886. Zitiert bei Marchand, Arch. f. experim. Pathol. Bd. XXIII. p. 387.
- 8) Filipowski, M. J., Archives d. scienc. biolog. St. Petersburg 1895.
- 9) Araki, Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. XIV. p. 405.
- 10) Dittrich, Archiv f. experim. Pathol. Bd. XXIX. p. 249.
- 11) Falk, Pflügers Arch. f. Physiol. Bd. XLV. p. 310.
- 12) Lehmann, Handatlas. Bd. I. p. 162.
- 13) Lüdke und Polano, München. med. Wochschr. 1909. Nr. 1.
- 14) Besredka, Annales de l'Institut. Pasteur. Bd. XV. 1901.
- 15) Voges, Berliner klin. Wochenschr. 1904.
- 16) Maschka, Prager med. Wochenschr. 1893. Nr. 19.

Nachdruck verboten.

Ueber die Agglutination der Choleravibrionen.

[Aus dem Laboratorium von Professor R. Emmerich-München.]

Von Hermann Barrenscheen.

Anläßlich der Choleraepidemie im Gouvernement Saratow 1907 wurde Zlatogoroff¹⁾ auf eine Anzahl aus dem Flußwasser gezüchteter Vibrionen aufmerksam, deren ursprüngliches kulturelles und biologisches Verhalten eine Deutung als Choleravibrionen nicht zuließ, die aber zum Teil durch wiederholte Uebertragung und Durchführung durch den Tierkörper nach einiger Zeit die für den Choleravibrio charakteristischen Eigenschaften, vor allem die Agglutinierbarkeit, erlangten. In einer Reihe von Experimenten zeigte er weiter, daß das Vermögen der Agglutinierbarkeit durch längeren Aufenthalt im Wasser bedeutend herabgesetzt wird. Bei der Wichtigkeit, welche diese Tatsache auch in der Praxis für die Identifizierung von Choleravibrionen aus Wasser hat, habe ich auf Veranlassung von Professor Emmerich die von Zlatogoroff mitgeteilten Experimente einer Nachprüfung unterzogen.

Zu den Versuchen wurde eine Kultur verwendet, die noch bei einer Serumverdünnung von 1:40000 deutlich agglutiniert wurde, bei allen Versuchen kam das gleiche hochwertige Serum zur Verwendung.

Zunächst wurde eine ganze, 24-stündige Agarkultur in ca. 15 ccm destilliertem Wasser durch Abspülen suspendiert. Nach 8 Tagen wurde die Suspension zentrifugiert und mehrmals gewaschen. Dieser in Bouillon suspendierte Bodensatz von Choleravibrionen wurde nach einer

1) Zur Frage der Choleradiagnose. (Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. XLVIII. Heft 5.)

Stunde noch bei Serumverdünnung 1:2000, nach zwei Stunden bei einer Verdünnung von 1:5000 agglutiniert.

Von der Aufschwemmung wurde nun eine Uebertragung auf Agar gemacht, diese nach 48 Stunden — nach 24 Stunden war das Wachstum noch überaus spärlich — abermals durch Abspülen in destilliertes Wasser (ca. 15 ccm) gebracht. Nach 7 Tagen zeigte sich nach einer Stunde schwache Agglutination bei einer Serumverdünnung von 1:200, nach zwei Stunden bei Verdünnung 1:400.

Bei einer zweiten Versuchsanordnung, die in genau derselben Weise ausgeführt wurde, bei der aber, um ein Hineinbringen von Nährmaterial zu vermeiden, die Choleravibrionen durch Uebertragen mit der Oese im destillierten Wasser suspendiert worden waren, wurden fast die gleichen Resultate erzielt. Nach der ersten Uebertragung und 7-tägigem Stehenlassen bei Zimmertemperatur zeigte sich eine Herabsetzung der Agglutinierbarkeit auf 1:300 nach einer Stunde, auf 1:1000 nach zwei Stunden. Die zweite Suspension wurde nach derselben Zeit nur mehr bei einer Serumverdünnung von 1:500 nach 2 Stunden agglutiniert. Eine Wiederherstellung oder Steigerung der einmal abgeschwächten Agglutinierbarkeit wurde durch tägliches Ueberimpfen der Kultur auf Agar während drei Wochen nicht erreicht, wohl aber zeigte sich eine Zunahme des anfänglich sehr spärlichen Wachstums.

Interessant war auch das Verhalten der Choleravibrionen in Isarwasser, das unterhalb des Einflusses eines der größten Sammelkanäle Münchens entnommen wurde. Es wurden zwei Proben angesetzt, eine von ca. 1 Liter, in der die kolossale Menge von 1½ 24-stündigen Agarkulturen verteilt wurde, die andere von ca. ½ Liter mit 3 Oesen. Während das Wasser in den ersten Tagen, namentlich bei der Suspension mit 1½ Agarkulturen stark milchig getrübt war, war schon nach drei Tagen von einer Trübung nichts mehr zu merken. Die Abnahme der Vibrionen war auch durch das Plattenzählverfahren zu konstatieren. Die Platten, welche unmittelbar nach der Aussaat und in den folgenden Tagen angelegt wurden, zeigten ursprünglich ein fast gleichförmiges Bild; schon nach 5 Tagen ließen sich jedoch durch das Plattenverfahren Cholerakolonien oder auch nur choleraähnliche nicht mehr nachweisen. Mittels Peptonwasserkultur ließ sich der Choleravibrio jedoch noch züchten, die Agglutination nach dieser Zeit trat aber nur mehr bei einer Serumverdünnung von 1:5000 — gegen 1:40000 der ursprünglichen Kultur — ein. Auffallend ist hier neben dem Verlust der Agglutinierbarkeit auch die schon makroskopisch sichtbare Abnahme der Choleravibrionen, die wohl einzig und allein auf die energische Freßtätigkeit der Flagellaten und anderer einzelliger Wasserbewohner zurückzuführen ist. Nach weiteren 5 Tagen ließen sich die Choleravibrionen auch in der Peptonwasserkultur nur mehr äußerst spärlich nachweisen, das mikroskopische Präparat der oberflächlichen Schicht zeigte nur äußerst spärliche, schwach gefärbte Kommabazillen. Die weitere Abnahme der Agglutinierbarkeit wurde nicht mehr verfolgt.

Dieses Verhalten der Choleravibrionen ist ganz analog dem der Typhusbacillen, für die eine gleiche Abnahme der Agglutinierbarkeit schon von Malvoz¹⁾, Rémy²⁾, Nicolle und Trenel³⁾, Hirsch-

1) Annales de l'Inst. Pasteur. 1901.

2) Ebenda. 1901.

3) Ebenda. 1902.

bruch¹⁾ u. a. konstatiert wurde, und beweist gleichzeitig, daß die Schwierigkeiten der Identifizierung von Choleravibrionen bei der Züchtung aus Wasser auch durch die spezifische Agglutination nicht vollkommen behoben sind.

Einer Beobachtung möchte ich schließlich noch Erwähnung tun, die schon Zlatogoroff²⁾ mitgeteilt hat und die von mir bestätigt werden konnte. Wurde nämlich durch Berkefeld-Filter filtrierte, vollkommen klare Abgußflüssigkeit des Zentrifugats einer 8-tägigen Suspension von Choleravibrionen in destilliertem Wasser mit Cholera-Immunserum versetzt, so zeigte sich schon nach 15 Minuten eine deutliche Opaleszenz, nach 6 Stunden deckte ein flockiger Niederschlag den Boden des Reagenzglases, die übrige Flüssigkeit war stark getrübt. Zweifellos haben wir es hier mit einem reichlichen Uebergang „agglutinabler“ Substanzen aus den Bakterien in das destillierte Wasser zu tun, ein Vorgang, der durch die geänderten osmotischen Verhältnisse, also rein physikalisch, vollkommen erklärt ist. Dieser Befund steht ganz im Einklang mit der von Paltauf³⁾ u. a. seinerzeit ausgesprochenen Ansicht, daß es sich bei der Agglutination um einen der Eiweißfällung und den Kolloidreaktionen analogen Vorgang handelt, eine Beobachtung, die auch seinerzeit von Emmerich⁴⁾ bei der Einwirkung der Pyocyanease auf verschiedene Bakterien, wie Typhusbacillen und Streptokokken, gemacht und im Sinne seiner Theorie⁵⁾ gedeutet wurde.

Nachdruck verboten.

Zur Technik der Versilberung von *Spirochaete pallida* (Schaudinn-Hoffmann).

[Aus der kaiserl. Universität zu Charkow (Rußland).]

Von Privatdozent Dr. med. **Johannes Barannikoff.**

Nachdem ich an den syphilitischen Fehlgeburten und dem anderen Material von hereditärer und erworbener Lues die von Volpino (für Schnitte) und Levaditi (für Stückchen) angegebenen Färbungsarten der raschen und langsamen Färbung der *Spirochaete pallida* ausprobiert hatte, gab ich — wegen der Beständigkeit der Resultate — der Brutschranktemperatur von 42° C bei den langsamen Färbungsarten den Vorzug. Ich möchte diese Temperatur den Arbeitenden empfehlen.

Die Leichenstückchen sowie auch Vivisektionsmaterial, bis zu 1 cm Größe und auch größer, dann aber nicht mehr als 0,5 cm dick, wurden mit verschiedenen Lösungen fixiert und gehärtet: 5—10-proz. Formalin,

1) Archiv f. Hyg. Bd. LVI. 1906.

2) l. c.

3) Die Agglutination. (Handbuch f. path. Mikroorg. Herausg. v. Kolle und Wassermann. Bd. IV. 1904, wo auch die weitere Literatur zu dieser Frage.)

4) Emmerich, R., Löw, O. u. Korschun A., Die bakteriolytische Wirkung der Nukleasen und Nukleasen-Immunproteidine etc. (Centralbl. f. Bakteriologie. Abt. I. Orig. Bd. XXXI. 1902. p. 1.)

5) Emmerich, R. u. Löw, O., Bakteriolytische Enzyme als Ursachen der erworbenen Immunität. (Zeitschr. f. Hyg. Bd. XXXI. 1899.)

Zenkersche Flüssigkeit, Kultschitzkysche¹⁾ Flüssigkeit, Schaudinnsche Lösung usw.

Nach dem — in den entsprechenden Fällen — unentbehrlichen sorgfältigen Auswaschen mit Zusatz von Jodkali und Wasserstoffhyperoxyd, wo es notwendig war, kamen die Stückchen in Aethylalkohol-Lösungen von steigender Konzentration und wurden in einer 80-proz. Lösung aufbewahrt.

Die Teilchen der gehärteten Stückchen werden, 2–5 mm dick (andere Dimensionen spielen keine Rolle), nach aufeinanderfolgenden Auswaschungen in Alkoholäther, darauf durch 80–50–30-proz. Alkohol in Wasser und darauf in eine 1–1¼-proz. Lösung von Argentum nitricum gebracht, welche Menge den totalen Umfang der genommenen Stückchen um das 12–15-fache übertraf. In dieser Lösung blieben die Stückchen bei einer Temperatur von 42° C 48–120 Stunden ununterbrochen oder mit beliebigen langen Intervallen.

Die Stückchen wurden aus dem Thermostaten nach dessen Abkühlung durch Auslösen des Brenners herausgenommen, 1 Stunde lang in 10mal gewechseltem Wasser abgespült und darauf der Wirkung einer 3–4-proz. wässerigen Lösung von Pyrogallsäure, in der sie bei Zimmer-temperatur 15–24 Stunden blieben, je nach der Konsistenz des Stückchens, ausgesetzt, oder ebenso lange mit 10–7½-proz. wässriger Lösung von „Agfa“-Rodinal entwickelt. Zu den Entwicklerlösungen setzte ich vor dem Eintauchen der Stückchen 3–6-proz. Formalin zu. Nach der Entwicklung folgte die Abspülung durch Wasserstrom während 1 Stunde, oder durch häufigen, 2–3 Stunden langen Wasserwechsel (bei Zimmer-temperatur). Nachher wurden die Stückchen durch Alkohol von steigenden Konzentrationen (3–4 Stufen) in Alkohol + Aether aa (2 Stufen), endlich in reinen Aether sulfuricus gebracht und in Celloidin in gewöhnlicher Weise eingebettet.

Die Mikrotomschnitte von 15–30 μ Dicke wurden im 80-proz. Alkohol aufgefangen und darin, wenn die weitere Behandlung nicht sofort nachfolgte, aufbewahrt.

Aus dem 80-proz. Alkohol herausgenommene Schnitte wurden in destilliertes Wasser gebracht, nachgefärbt, oder ohne Nachfärbung mit absolutem Alkohol entwässert, in Xylol durchsichtig gemacht und in Kanadabalsam eingeschlossen.

Nachfärbung erfolgte mit Hämatoxylin-Eosin, Hämatoxylin-Fuchsin, Methylenblau und Eosin, oder meinem eigenen Farbstoffe für Malariaparasiten-Kern- und Plasmafärbung.

Zu diesem letzten Farbstoffe möchte ich hier bemerken, daß auf p. 44 meiner Doktor-Dissertation gedruckt ist: „Es ist mir gelungen, aus der oben erwähnten (Romanowskyschen) Farbstoffmischung eine violette Masse ganz rein zu erhalten. Sie hat sich als sehr dauerhaft erwiesen.“ Weiter steht auf p. 178 meines Buches (Beiträge zur Frage über den Blutparasitismus bei menschlicher Malaria. Charkow 1897), daß ich mein Dissertationsmaterial vom Februar 1894 bis Ende des Jahres 1896 bearbeitet habe, es ist daher ganz klar, daß ich keine Giemsa-Lösung für die entsprechenden Farbenbilder zu benutzen brauchte und imstande war, alle die vortrefflichen Nuancen mit meinem

1) Kultschitzky, N., Die Lehre vom Mikroskop und die Technik der mikroskopischen Untersuchung. 3. Aufl. Charkow 1907.

eigenen Farbstoffe wie mit der guten Giemsa'schen Lösung zu erhalten.

Alle oben erwähnten Versilberungsmanipulationen wurden von dem Momente an, wo die Stückchen in Fläschchen von tiefbraunem Glas mit Silbernitratlösung gebracht worden waren, bis zu dem Einschließen in Kanadabalsam der Vorsicht halber im dunklen Zimmer bei rubinroter Lampe ausgeführt, welche letztere nicht unvermeidlich ist.

Nach dieser Art wurden untersucht: Leichenstückchen syphilitischer Aborte, eine Neubildung an dem Gesichte eines Luetikers (Biopsie); Stückchen der schon im Jahre 1903 von mir seziierten Leiche eines an Miliargummen, die in allen Organen gefunden wurden, gestorbenen Knaben; Stückchen einer „Feuersteinleber“ (die Sektion datiert auch vom Jahre 1903), Primäraffektgeschwülste und Papeln kindlicher After. In allen Fällen habe ich positiven Erfolg gehabt. Die Spirochäten sahen schwarzbraun gefärbt aus, das ganze Gewebe gelb; makroskopisch hatten die Präparate eine hellbräunliche Farbe; das Gewebe enthielt weder große noch kleine körnige Silbernitratniederschläge. Diese letzteren traten in den gleich in Kanadabalsam eingeschlossenen Präparaten (wie auch in den vorläufig in 70–80-proz. Alkohol aufbewahrten Schnitten) nur vom Ende von 3–4 Wochen nach Kanadabalsameinschließung auf¹⁾.

Zuweilen aber, wenn die Oberfläche des Schnittes bei den Nachfärbungs- und Abspülungsmanipulationen lange Zeit in Berührung mit der Luft gekommen war, entstand an der Oberfläche des Präparates ein Niederschlag von feinen braunen Körnchen. Besonders scharf traten solche Niederschläge bei der Verzögerung der Entwässerung und beim zufälligen Austrocknen der Schnitte mit Xylol hervor, wo längs den Falten der Kern- resp. Zelloberfläche und deswegen in den intercellulären Spalten zarte Fränschen sich finden, welche Fränschen von Friedenthal (Berl. klin. Wochenschr. 1907. No. 36) als Spirochäten, mit denen sie aber außer der flüchtigen Ähnlichkeit in der Farbe nichts zu tun haben, beschrieben worden sind.

Wer ein Negativ-Präparat (dessen mikrophotographische Aufnahme die schwarzen Spirochäten auf dem hellen Negativfelde zeigt), zu erhalten wünscht, kann folgendermaßen verfahren: Das versilberte Präparat (nachdem man dessen erste Mikrophotogramme gemacht hatte) wird mit Hämatoxylin nach Heidenhain gefärbt; die Spirochäten entfärben sich vollständig in Eisenalaun, das Gewebe aber bekommt — bei dementsprechendem Differenzierungsgrade — eine dunkle Färbung, auf welchem Grunde die Spirochäten mit ihren regelmäßigen Windungen farblos (hell) erscheinen und mit einer eigentümlichen Lichtbrechung, die weder den elastischen Fasern, noch den Knorpel-elementen eigen ist. Wenn man jetzt ein zweites Photogramm von demselben Platz des Präparates aufnimmt, kann man sich überzeugen, daß die Spirochäten in Zahl, Form und Anordnung unverändert dieselben Abbildungen zeigen — schwarz auf dem zweiten und durchsichtig (hell) auf dem ersten Negativ.

Dieselbe Silbernitratbehandlung mit dem gleichen Erfolge habe ich angewendet auch bei der Bearbeitung der Gewebsschnitte, nur mit

1) Die nach dieser Art bearbeiteten Präparate waren fast allen Herren Professoren medizinischer Fakultät der Kais. Universität zu Charkow und 23. Dez. 1906 in der Sitzung der Charkower medizinischen Gesellschaft demonstriert worden.

entsprechender Verkürzung der Prozeduren und — unter Umständen — bei vorläufiger Bedeckung der freien (ungeklebten) Schnittoberfläche mit einem dicht aufgelegten Deckgläschen, Objektträger, entweder mit feinen Membranen aus sehr flüssigem Celloidin, oder nach der Einklemmung der Schnitte zwischen zwei dünne Holzlamellen.

Um die Spirochätenfärbung im Blut zu erhalten, verfuhr ich folgendermaßen: Das entnommene (in sterilisierten Celloidinsäckchen) Blut ließ ich von sich selbst — bei Zentrifugation — koagulieren und bearbeitete die Gerinnsel genau wie die Organstückchen, d. h. fixierte, wusch aus, versilberte, entwickelte, bettete ein usw. Die Resultate fielen in den Luesfällen immer positiv aus, in den Kontrollen, d. h. nicht syphilitischen, so gut wie gar nicht.

Da ich schon bei den anfänglichen mikroskopischen Untersuchungen sehr zahlreiche Spirochäten nicht nur in den Darmepithelzellen, sondern auch im Inhalte des Darmes gefunden habe, so lag es nahe, zu denken, ob es möglich wäre, Lues congenita durch Kotuntersuchungen Neugeborener zu diagnostizieren. 4 voraus bekannteluetische Fälle und 10 Kontrollfälle haben mir den Beweis geliefert, daß in den Fällen, wo die Meconiumuntersuchung positive Resultate für Spirochätenfärbung gibt, auch Lues vorliegt. Deswegen ist es in verdächtigen Fällen, in denen man unter Umständen weder Placentastückchen noch Kinderblut mikroskopisch untersuchen kann, wichtig, zu der Meconiumversilberung nach Zentrifugation in Celloidinsäckchen zu greifen.

Immerhin ist es notwendig, jedes neue Material stets gleichzeitig, aber in einzelnen Fläschchen, mit den bekannten positiven und negativen Kontrollen zu bearbeiten.

Auf Grund vieler vergleichender Untersuchungen verschiedener Objekte, die schon seit langer Zeit oder neuerdings (frische) fixiert worden waren, kann ich folgendes behaupten:

1) Die *Spirochaetae pallidae*

a) sind Bildungen, deren Aussehen, Form, Größe, Menge und Verteilung im Nerven-, Muskel-, Knochen-¹⁾ und anderen Systemen in keinem Zusammenhange mit den oben erwähnten Eigenschaften der normalen Bestandteile dieser Systeme steht.

b) Die Spirochäten werden beeinflußt durch die Dichtigkeit und gegenseitige Anordnung jener Bestandteile, oder durch den Bau und die Zusammensetzung der von diesen gebildeten Gewebe und Organe. In den Epithelial-, Nerven-, Muskel- und Bindegewebszellen, auch zwischen den Fasern der entsprechenden Zellen treten die Spirochäten als fremde Elemente, nicht aber als Veränderungs- oder Degenerationsprodukte der Zellen-, Faser- oder Zwischensubstanz selbst auf.

c) Die Spirochäten bilden Bestandteile, die dem normalen Bau und der Entwicklung des gesunden Organismus der Kinder und Tiere ganz fremd sind; ich fand sie nur bei Kranken, bei Syphilitikern. Gleich, wie es bei allen „echten“ lebenden und lebensfähigen Parasiten der Fall ist,

1) Die Stückchen, die entkalkt sein mußten, fixierte ich 24 Stunden in 10-proz. Formalin und brachte sie nach 3-stündiger Abspülung in eine Mischung von gleichen Teilen 6-proz. Solution Acidi nitrici und einer 10-proz. Formalinlösung (in 95-proz. Alkohol); diese Mischung wurde alle 5—6 Tage gewechselt, bis die Stückchen beim Durchstiche mit feiner Nadel kein Knistern empfinden ließen. Gründliches Auswaschen usw.

werden die Spirochäten in den Stellen des an Syphilis leidenden Organismus gefunden, wo von pathologischen Veränderungen der Gewebselemente noch keine Spur zu bemerken ist.

2) Eine 3 $\frac{1}{2}$ -jährige Aufbewahrung der Leichenstückchen in Celloidin schadet den Spirochäten und ihrer Färbbarkeit und der Reinheit der Präparate nicht. Die Syphilisleichenstückchen, während dieses Zeitraumes nach den Methoden von Prof. Melnikow-Razwedenkow und Prof. Kaiserling aufbewahrt und nach meiner Behandlungsart — wobei ich Versilberung und Entwicklung derselben Stückchen 3—4mal wiederholte — bearbeitet, gaben mir auch hübsche positive Erfolge.

3) Das Bild, das ich von den Organen eines im Uterus mazerierten syphilitischen Fötus bei Entnahme der Stückchen von der noch warmen Leiche bekam, unterschied sich nur sehr wenig von dem, welches mir in derselben Weise behandelte Stückchen gaben, die derselben Leiche und denselben Organen nach 5-tägiger Aufbewahrung an einem kalten Orte entnommen waren.

4) Einige Organe (Leber, Milz u. a.)luetischer Embryonen, die durch lange intrauterine Mazeration der Gewebe in eine butterartige Masse verwandelt worden waren, zeigten bei der Fixation mit 8—10-proz. Formalin oder nach Zenker und bei der Versilberung nach der oben beschriebenen Art massenhafte Spirochäten, welche an vielen Stellen die ganze schöne korkzieherförmige Gestalt behalten haben, während die ceteris paribus bearbeiteten Organe gesunder frühgeborener, absichtlich aseptisch und unaseptisch mazerierter Tiere (Kaninchen, Hunde, Meerschweinchen, Hühner) und Kinder keine Spirochätenanwesenheit gezeigt haben.

Herren Professoren P. Mickin und N. Melnikow-Razwedenkow, sowie auch Herrn Dr. W. Kuschelewsky spreche ich für das Stellen des Untersuchungsmaterials meinen innigsten Dank aus.

Nachdruck verboten.

Ein neues Verfahren zum quantitativen Nachweis des Bacterium coli in Wasser, zugleich ein Beitrag zum Verhalten dieses Keimes in Flüssen und Schwimmbassins.

[Aus dem Hygienischen Institut Göttingen (Direktor: Geh. Med.-Rat
Prof. Dr. E. v. Esmarch).]

Von Dr. med. **Marmann**,

Stadtarzt in Chemnitz, früherem Assistenten des Instituts.

Dem Nachweis des Bacterium coli im Wasser wird bekanntlich eine verschiedene Bedeutung zugemessen. Eine Reihe Autoren, wie Kruse (1), Moroni (2), Weissenfeld (3), Paposotiriu (4) u. a., schreiben dem Fund von Coli-Bacillen im Wasser überhaupt keine Bedeutung zu, da dieselben so sehr in der Natur verbreitet seien, daß auch ein Hineingelangen in das Wasser nichts Befremdendes an sich trage. Demgegenüber verfechten andere Forscher, wie Levy und Bruns (5),

Chik (6), Petruschky und Pusch (7), Winslow (33), Eijkman (8), Vincent (32), Christian (9), Kaiser (10), Neumann (11), Ressel (12) u. a. den Standpunkt, daß das *Bact. coli* ein Darmbewohner sei und daher sein Vorkommen in der Natur durch eine direkte oder indirekte Verunreinigung des Fundorts mit menschlichen oder tierischen Fäkalien bedingt sei.

Auch das Ergebnis zahlreicher im Göttinger Hygienischen Institut ausgeführten Wasseruntersuchungen weist darauf hin, daß der *Coli-Bacillus* sich durchaus nicht in allen Wässern findet. Eine Anzahl dieser Untersuchungen sind in Tabelle I zusammengestellt. Die Methode des Nachweises soll später besprochen werden.

Inwieweit die verschiedenen Resultate der Anhänger und Gegner der Ubiquitätslehre durch verschiedene Methodik in der Art des Nachweises und durch mehr oder weniger genaue Präzisierung der dem *Bac. coli* beizulegenden Eigenschaften bedingt sind, soll an dieser Stelle nicht erörtert werden. Darin sind sich jedenfalls die meisten Autoren, welche sich mit der *Coli*-Frage beschäftigt haben, einig, daß die *Coli*-Bacillen in verunreinigtem Wasser häufiger und in größerer Menge gefunden werden als in reinem, und daß daher dem quantitativen Nachweis derselben im Wasser eine gewisse Bedeutung nicht abzusprechen ist. Dies wird einstimmig betont von v. Freudenreich (13), Savage (14), Houston (15) u. a. Auch Kruse, der im übrigen die Ubiquitätslehre vertritt, sagt: „Man findet im allgemeinen in um so kleineren Wassermengen *Coli*-Bacillen, je stärker das betreffende Wasser verunreinigt ist.“ Derselbe Autor betont die Bedeutung, welche dem *Coli*-Nachweis bei eingesandten Wasserproben zukommt, bei denen die Keimzählung unrichtige Ergebnisse liefert.

Es dürfte daher ein bereits seit längerer Zeit im Göttinger Hygienischen Institut geübtes Verfahren zum quantitativen Nachweis von *Coli*-Bacillen im Wasser ein gewisses Interesse beanspruchen. Wie bereits an anderer Stelle kurz erwähnt (16, 17), bezweckt dasselbe, eine Wassermenge von 5–10 ccm auf einer mit einem geeigneten Nährboden versehenen Platte rasch zum Verdunsten zu bringen und die nach Bebrütung entstandenen *Coli*-Kolonieen direkt zu zählen. Als Nährboden hat sich uns der von Endo (18) angegebene vorzüglich bewährt, auf welchem die *Coli*-Keime nach 20–24-stündiger Bebrütung bei 41° zu tiefroten, durch lebhaften Fuchsinglanz und roten Hof ausgezeichneten Kolonieen auswachsen. Die Verdunstung des Wassers wurde so bewirkt, daß in der Mitte eines Kastens von ca. $\frac{1}{4}$ qm Bodenfläche und 1 m Höhe ein kräftiger elektrisch betriebener Ventilator angebracht wurde, welcher die Luft senkrecht von unten nach oben trieb. Im Boden des Kastens befand sich ein Loch und unmittelbar über demselben ein Bunsenbrenner, so daß die nach oben getriebene Luft auf etwa 30° vorher angewärmt wurde und daher mehr Feuchtigkeit aufnehmen konnte. Oberhalb des Ventilators wurden die mit dem Wasser beschickten Endo-Platten auf luftdurchlässiger Unterlage genau horizontal aufgestellt. Im Deckel des Kastens befanden sich einzelne Löcher, aus denen die erwärmte feuchte Luft entweichen konnte. Auf diese Weise gelingt es, in 30–40 Minuten 5 ccm Wasser vollkommen zu verdunsten. Zu beachten ist, daß die Platten nicht eher dem Brutschrank anvertraut werden, bis sie vollkommen trocken sind, weil sonst nicht einzelne scharf umschriebene Kolonieen aufschießen, sondern dieselben leicht zerfließen. Auch empfiehlt

Tabelle I.

Herkunft der Wasserprobe	Wann untersucht	Keimzahl	Auf Coli- bacillen untersuchte Wassermenge ccm	Anzahl der darin gefundenen Colibacillen
Gronau, 24 m tiefer Röhren- brunnen	7. Okt. 08	950	15	keine
Duderstadt, 6 m tiefer, zemen- tierter und mit Zementplatte ver- sehener Kesselbrunnen. Pum- penrohr 7 m entfernt	19. Dez. 07	110	15	„
Naede, Hochbehälter einer Quell- wasserleitung	10. Nov. 08	41	25	„
Obernkirchen, alter Bergwerks- stollen	17. Dez. 08	74	5	„
Catlenburg, Felsenquelle, nicht gefaßt	11. März 08	nicht be- stimmt. Ent- nahme und Transport nicht einwandfrei	10	„
Sülbeck, offene Quelle	7. Okt. 08	wie vor.	5	50
Oberode, Quellwasserleitung	17. Okt. 08	58	5	keine
Hajen, mit Brettern bedeckter Ziehbrunnen, Fugen im Innern mit Moos verstopft	7. Okt. 07	21 567	10	100
Norden, offener Teich				
Rohwasser	24. April 07	582	4	keine
filtriertes Wasser	dgl.	268	8	„
Kesselbrunnen Göttingen	4. Dez. 08	2	10	„
dgl.	dgl.	290	10	„
dgl.	dgl.	964	10	„
dgl.	dgl.	376	10	„
Stadtoldendorf, Quellwasser- leitung	13. Aug. 08	14	10	„
Kesselbrunnen Göttingen	11. Juli 08	332	5	„
Tiefbrunnen	dgl.	103	5	2
Kesselbrunnen	dgl.	19	5	keine
Lenglern, geschlagener Brunnen	22. Juni 08	211	10	„
Lenglern, Kesselbrunnen	dgl.	3 444	16	„
Kesselbrunnen Göttingen	20. Juni 08	1 030	5	„
Tiefbrunnen	7. Dez. 07	240	1	1
Kesselbrunnen	4. Juni 07	1 320	5	40
„	dgl.	720	5	50
„	dgl.	1 500	5	500
Röhrenbrunnen Weende	1. Juni 07	620	10	1
Himmigerode, nicht gefaßte Quelle	2. Jan. 08	283	12	keine
Grone, mit Holz gedeckter Kessel- brunnen	26. Febr. 08	46 503	7	700
Offene Quelle Dorste	13. Juli 06	446	100 (nach Eijk- man)	keine
dgl. Dorste	dgl.	31	20 (nach Eijk- man)	„
Zellerfeld-Kesselbrunnen	4. Febr. 07	?	6	„
Peine, Brunnen	7. April 07	139	10	„
Clausthal, Quellwasserleitung	17. April 07	5 040	6	„
Lauterberg, Ziehbrunnen	25. Sept. 08	423	5	„
dgl., mit Eisen gedeckter Kessel- brunnen	18. Febr. 08	482	10	„

Herkunft der Wasserprobe	Wann untersucht	Keimzahl	Auf Coli- bacillen untersuchte Wassermenge ccm	Anzahl der darin gefundenen Colibacillen
Uschlag, gefaßte Quelle	9. April 08	29	10	keine
dgl., offene Quelle	20. Aug. 07	108 000	10	"
dgl., offene Quelle	27. Nov. 07	310	10	"
St. Andreasberg, Teich nicht fil- triert	16. Dez. 07	460	10	"
Vogelbeck, Förderschacht	26. Aug. 08	1 140	10	"
Elliehausen, Brunnen	4. Jan. 09	20	10	"
Einbeck, Quellwasserleitung	2. Mai 07	13	10	"
dgl.	3. Aug. 07	196	10	5
dgl.	11. Mai 08	85	10	keine
dgl.	30. Okt. 08	46	15	"
dgl., Röhrenbrunnen	8. Aug. 08	15	10	"
dgl., Kesselbrunnen	18. " 08	1 780	10	"
Hohen-Hamel, offener Teich	11. " 08	517	5	20
dgl., Brunnen	dgl.	731	15	150
Weissenborn, offene Quelle	8. Juli 08	42	10	keine
Kesselbrunnen Göttingen	19. Juni 08	25	15	"
Schildweg, Brunnen	18. April 08	390	15	90
Osterode, unfiltriertes Bachwasser	27. Juni 07	790	10	50
dgl., filtriert	dgl.	465	10	8
" "	1. Juli 07	386	10	20
" "	dgl.	265	10	7
dgl., Apenkehochbehälter bzw. -leitung (gespeist von 2 Quell- wässern und einem filtrierten Bachwasser)	27. Juni 07	430	10	11
" "	1. Juli 07	3 450	10	26
" "	dgl.	784	10	22
Osterode, Quelle in freiem Felde	2. Mai 07	51	4	keine
dgl.	24. April 07	17	4	"
dgl., Brunnen	22. Febr. 07	55 000	15	62
dgl., mit Holz gedeckter Kessel- brunnen	dgl.	3 560	16	10
dgl., Schöpfbrunnen	dgl.	1 685	11	keine
dgl., Brunnen	dgl.	48	16	"
" "	27. Febr. 07	656	30	"
dgl., Wasserleitung	dgl.	38	20	"
" "	dgl.	164	20	"
dgl., mit Beton gedeckter Kessel- brunnen	16. April 07	22	13	"
dgl., mit Holz gedeckter Kessel- brunnen	dgl.	114	21	"
dgl., offene Quelle	dgl.	108	21	10
Holzminden, 8 gefaßte Quellen	26. Okt. 08	alle unter 20	je 5	keine
dgl., offener Wasserlauf	dgl.	52	10	"
" "	dgl.	57	10	"
dgl. gefaßte Quelle" Reese	12. Mai 08	500—800	5	"
" "	26. Sept. 08	"	5	"
" "	9. " 08	"	5	"
dgl., gefaßte Quelle Forst	12. Mai 08	500—800	5	"
" "	9. Sept. 08	"	5	"
" "	26. " 08	"	5	"
dgl., gefaßte Quelle	28. Aug. 08	1 960	5	"
dgl., gefaßte Quelle (Schütte)	12. Juni 07	130	5	ja
" "	17. " 07	710	5	keine
" "	27. Aug. 07	1 229	5	"
" "	31. " 07	28 185	5	1
" "	24. Okt. 07	6 271	5	keine
" "	28. " 07	414	5	"

Herkunft der Wasserprobe	Wann untersucht	Keimzahl	Auf Coli- bacillen untersuchte Wassermenge ccm	Anzahl der darin gefundenen Colibacillen
Münden, von Röhrenbrunnen gespeiste Wasserleitung. Pumpstation	5. Nov. 07	9	10	keine
	24. Dez. 07	268	5	"
	7. Juli 08	36	10	"
	21. Okt. 08	398	5	"
dgl., Wasserleitung	5. Sept. 07	9	10	"
	24. Dez. 07	83	6	"
	7. Juli 08	118	10	"
	21. Okt. 08	10	5	"
Brunnen, Schlachthof Hannöv.-Münden	16. Mai 08	3 840	5	"
dgl.	dgl.	3 172	5	276
Niederscheden, offene Quelle	21. Jan. 08	154	7	keine
Uslar, durch offene Röhre fließende Quelle	17. Aug. 07	4 060	10	80
dgl., eingemauerte Quelle	20. „ 07	40	10	keine
Silberborn, eingemauerte Quelle	7. „ 07	41	20	1
Stendal, Wasserleitung	12. Dez. 07	8	10	keine
	19. Mai 08	92	6	"
	14. Nov. 08	13	15	"
Alfeld, Quellwasserleitung, Quelle	9. Aug. 07	103	10	5
	23. April 08	22	5	keine
	25. Nov. 08	574	5	"
dgl., Leitung	9. Aug. 07	412	10	2
	23. April 08	22	5	keine
	25. Nov. 08	544	5	"
Bovenden, Brunnen I (Kesselbrunnen)	27. Aug. 07	120	5	6
dgl. II	dgl.	832	5	80
dgl. III	dgl.	765	5	300
dgl. IV	dgl.	30 000	5	500
dgl. V	20. Aug. 07	900	5	125
dgl. VI	dgl.	1 000	5	500
dgl. VII	dgl.	500	5	20
dgl. VIII	dgl.	100	5	15
Grone, Kesselbrunnen No. 1	5. Aug. 07	610	12	171
dgl. II	8. „ 07	98	12	keine
dgl. III	16. Juli 07	3 300	10	2 500
dgl. IV	dgl.	700	10	1
dgl. V	dgl.	100	10	keine
dgl. VI	dgl.	1 000	10	4
dgl. VII	11. Juli 07	2 560	10	60
dgl. VIII	dgl.	1 984	10	20
Marisspringquelle	1. Aug. 07	5 520	12	5 800
Gronebach	11. Juli 07	320 000	10	16 000

es sich, die Platte kurz vor dem Begießen mit der betreffenden Wasserprobe zu trocknen, damit der Nährboden mehr Wasser aufnehmen kann. Des weiteren ist es unbedingt nötig, daß die Oberfläche des Endo-Agars während der Verdunstung sich genau in horizontaler Lage befindet. Ist dies nicht der Fall, so sammelt sich das Wasser an der tiefsten Stelle an und die nicht vom Wasser bedeckten Stellen des Nährbodens werden rissig und die Keime ungleichmäßig verteilt. Zwar kann man diesem

Uebelstände durch zeitweises Hin- und Herneigen der Platte zum Teil abhelfen. Einfacher jedoch ist es, die leeren sterilen Platten durch kleine Stifte u. dergl. auf dem über dem Ventilator befindlichen Gestell zu fixieren, dann zu gießen und genau in derselben Lage erstarren zu lassen, welche sie auch während der Verdunstung einnehmen. Bei Beobachtung dieser Vorsichtsmaßregel braucht man keinerlei hohe Anforderungen an präzise Ausführung des Kastens zu stellen und kann jede alte Kiste dazu benutzen. Die Bebrütung bei 41° hat sich der bei 37° überlegen gezeigt, weil dadurch mehr Wasserbakterien in der Entwicklung gehindert werden.

Es liegt auf der Hand, daß dieses Verfahren vor den bisher üblichen eine Reihe Vorteile genießt. Im allgemeinen wird der quantitative Nachweis der Coli-Bacillen heute durch Bestimmung des Coli-Titers geführt: 100,0; 10,0; 1,0; 0,01; 0,001 etc. ccm Wasser werden mit einer geeigneten Nährflüssigkeit zusammengebracht und zunächst bebrütet, wobei durch Zufügung bestimmter chemischer Mittel, wie Karbol etc., oder durch Beobachtung höherer Temperatur eine Anreicherung der Coli-Bacillen zuungunsten der anderen Wasserbakterien versucht wird. Diejenigen Proben, welche Wachstum zeigen, müssen jedoch meist noch weiterhin darauf geprüft werden, ob sie wirklich Coli-Bacillen enthalten. Aber auch wenn das Verfahren eine gewisse Gewähr bietet, daß sofort Coli-Bacillen angezeigt werden, so z. B. die Gärungsprobe bei 46° nach Eijkman, welche noch von Bulir (19) verbessert ist, so hat diese Art des quantitativen Nachweises den Nachteil, daß zur Untersuchung einer Wasserprobe eine ganze Versuchsreihe nötig ist. Wenn man auf einer Endo-Platte 10 ccm Wasser verdunstet und die ausgewachsenen Coli-Kolonien zählt, so erhält man sofort die Coli-Menge in 10,0, 1,0, 0,1, 0,01 ccm. Dazu ist bei dem Verfahren mit flüssigen Nährböden nicht allein die Ansetzung von 4 verschiedenen Proben nötig, sondern es kommt noch in Betracht, daß bei dieser letzten Methode es immer noch ungewiß ist, ob sich Coli-Bacillen in 1 oder 9, 10 oder 90, 100 oder 900 ccm finden, vorausgesetzt, daß man nicht noch mehr verschiedene Verdünnungen ansetzt. Auch setzt dieses Verfahren voraus, daß die Keime stets gleichmäßig verteilt sind. Es kann sehr leicht vorkommen, daß sich einmal ein Coli-Keim in eine Wassermenge von $\frac{1}{100}$ ccm verirrt und dann 100 Coli im Kubikzentimeter anzeigt, obgleich vielleicht tatsächlich ihre Anzahl viel geringer ist.

Diesen Ausführungen gegenüber könnten mit Recht Einwände erhoben werden. So könnte man einwerfen, daß flüssige Nährböden die Keime leichter zur Entwicklung bringen als feste; Venema (20) betont, daß das Plattenverfahren des Coli-Nachweises in Wasser nicht ausreiche und daß ein Anreicherungsverfahren nötig sei.

Es wurde daher eine Reihe vergleichender Untersuchungen ausgeführt sowohl mit solchen Wässern, in denen man wenige, als solche, in denen man viele Coli-Bacillen vermuten konnte. Es wurde zum Vergleich herangezogen das Verfahren von Petruschky und Pusch, Eijkman und zuweilen auch das von Bulir und die Gelatineplatte. Wie Tabelle II und III zeigen, konnte ein wesentlicher Vorteil der flüssigen Nährböden in dieser Beziehung nicht konstatiert werden. Zwar zeigten dieselben zuweilen in kleineren Wasserquantitäten Coli-Bacillen an als die Endo-Platte. Oft aber blieben sie in dieser Beziehung hinter dem Verdunstungsverfahren zurück. Es konnte auch des öfteren beob-

achtet werden, daß durch die flüssigen Nährböden in derselben Wasserprobe bei Verarbeitung größerer Wassermengen keine Coli-Bacillen gefunden wurden, während dies bei Verarbeitung kleinerer Wassermengen der Fall war, sei es nun, daß in ersterem Falle die Coli-Bacillen von anderen überwuchert wurden, sei es, daß sich zufällig einmal ein Coli-Keim in die kleinere Wassermenge verirrt. Zu bemerken ist, daß sowohl die in den flüssigen Nährböden wie bei dem Verdunstungsverfahren zur Entwicklung gelangten Coli-Keime in der Regel als zur Coli-Gruppe gehörig erachtet wurden, wenn sie den von Conradi und v. Drigalski angegebenen Lackmus-Nutrosenährboden röteten, Oldekops Neutralrotagar unter Gas- und Fluoreszenzbildung entfärbten und in 48-stündigen Bouillonkulturen mit der Ehrlichschen Probe die Indolreaktion gaben; in vielen Fällen wurden die Keime auch auf ihr Verhalten auf Gelatine geprüft.

Des weiteren kann mit Recht die Frage aufgeworfen werden: Sind denn auch wirklich alle auf der Endo-Platte mit Fuchsinglanz wachsenden Kolonien Coli-Keime, und kommt es nicht vor, daß typische Coli-Bacillen auf diesem Nährboden ohne Fuchsinglanz wachsen? In dieser Beziehung sei bemerkt, daß bei vielen Hundert Wasseruntersuchungen von den auf der Endo-Platte mit Fuchsinglanz wachsenden Kolonien stets einige in der vorhin beschriebenen Weise geprüft wurden. Indolbildung konnte zwar nicht immer, aber doch in den meisten Fällen nachgewiesen

Tabelle II.

Versuchsmaterial	Verdünnung in Kubik- zentim- etern	Ver- dunstungs- verfahren	Petruschkys Verfahren	Eijkmans Verfahren	Gelatine	Be- merkungen
Leinekanalwasser Probe No. 1	$\frac{1}{10}$	unzählbar	+	+		Die Resultate stimmen also auch in verschiedenen Verdünnungen überein
dgl.	$\frac{1}{100}$	94	+	+		
dgl.	$\frac{1}{1000}$	8	+	+		
dgl.	$\frac{1}{1000}$	11	+	+		
dgl.	$\frac{1}{10000}$	1	+	+		
dgl. Probe No. 2	$\frac{1}{100}$	17	+	+		
dgl.	$\frac{1}{1000}$	2	+	+		
dgl.	$\frac{1}{10000}$	0	+	0		
Kotaufrschwemmung Mensch No. 1	$\frac{1}{1000}$	163			152	
dgl. No. 2	$\frac{1}{1000}$	52			43	
dgl. No. 3	$\frac{1}{1000}$	48			52	unzählige coliähnliche
dgl. Kuh	$\frac{1}{1000}$	31			32	
dgl. Huhn	$\frac{1}{1000}$	26			24	
dgl. Schwein	$\frac{1}{500}$	50			44	
dgl. Maus	$\frac{1}{150}$	270			200	
dgl. Fisch	$\frac{1}{10}$	0				
Coli-Aufrschwemmung (2 Stämme)	$\frac{1}{10}$	unzählige	+	+		
dgl.	$\frac{1}{100}$		+	+		
dgl.	$\frac{1}{1000}$	2016	+	+		
dgl.	$\frac{1}{10000}$	196	+	+		
dgl.	$\frac{1}{100000}$	23	+	Trübung		
dgl.	$\frac{1}{1000000}$	1	+			
dgl.	$\frac{1}{10000000}$	0	klar	0		

Tabelle III.

Laufende No.	Herkunft der Wasserprobe	Zeit der Entnahme	Verdunstungsverfahren		Verfahren Petruschkys		Verfahren Eijkmans		Verfahren Bulirs		Es fanden sich also Coli-keime im Kubikzentimeter				
			verarbeitete Wassermenge ccm	Anzahl Coli-bacillen	verarbeitete Wassermenge ccm	Coli?	verarbeitete Wassermenge ccm	Coli?	verarbeitete Wassermenge ccm	Coli?	bei dem Verdunstungsverfahren	bei dem Verfahren Petruschkys	bei dem Verfahren Eijkmans	bei dem Verfahren Bulirs	
1	Leinefluß vor Verunreinigung mit Göttinger Abwässern	23. 12. 08	5	5	5,0 3,0 1,0 0,5 0,1 0,01	nein " ja " nein " "	10,0 1,0 0,5 0,1	ja " nein " "	10,0 1,0 0,5 0,1	nein ja nein "	1	1—9	1—4	1—4	
2	Kesselbrunnen in Göttingen	13. 1. 09	5	2			50,0 50,0 50,0 50,0 5,0 1,0 0,1	ja nein ja nein " " " " " "		0,4		0,01—0,2			
3	Leinekanal in Göttingen, bereits verunreinigt	13. 1. 09	5	ca. 500			0,1 0,01 0,001	" " ja " "		100			100—900		
4	Leinefluß 5 m unterhalb der Göttinger Abwässer, entnommen auf der Seite der Einleitung	28. 12. 08	5 ccm einer Verd. 1:1000 5 ccm einer Verd. 1:10	25 1 Kol. gibt kein Indol ca. 2700	0,5 0,05 0,005 0,0005	nein " ja (kein Indol) nein	0,05 0,005 0,0005	ja " nein	0,05 0,005 0,0005 0,00005	ja " " nein	ca. 5000	200—1900	200—1900	2000—19000	
5	dgl.	17. 1. 09	1 ccm einer Verd. 1:100	43	0,01 0,001 0,0001 0,00001	nein ja " " "				4300		1000—9000			
6	125 m unterhalb der Einleitung der Göttinger Abwässer. Linkes Ufer	28. 12. 08	5 ccm einer Verd. 1:1000 5 ccm einer Verd. 1:10	6 1350			5 ccm einer Verd. 1:1000	nein	5 ccm einer Verd. 1:1000	nein	1200—2700		weniger als 200	weniger als 200	weniger als 200

Lfd. No.	Herkunft der Wasserprobe	Zeit der Entnahme	Verdunstungsverfahren		Verfahren Petruschky		Verfahren Eijkmans		Es fanden sich also Coli-keime im Kubikzentimeter	
			verarbeitete Wassermenge ccm	Anzahl der Colibacillen	verarbeit. Wassermenge ccm	Coli?	verarbeit. Wassermenge ccm	Coli	bei dem Verdunstungsverfahren	bei dem Verfahren Petruschky
7	200 m unterhalb der Einleitung der Göttinger Abwasser, linkes Ufer	28. 12. 08	5 ccm einer Verd. 1:1000 5 ccm einer Verd. 1:10	3 400	0,5 0,05 0,005	nein ja nein			600—800	20—190
8	200 m unterhalb der Einleitung der Göttinger Abwasser, rechtes Ufer	10. 1. 09	5 ccm einer Verd. 1:100	34	0,01 0,001 0,0001 0,00001	ja nein " "			680	100—900
9	Ca. 1300 m unterhalb Einmündung der Göttinger Abwasser, kurz vor Einfluß der Grone	17. 1. 09	2 ccm einer Verd. 1:100	25	0,01 0,001 0,0001 0,00001	ja " nein "			1250	1000—9000
10	Eselstieg, ca. 1500 m unterhalb Einmündung der Göttinger Abwasser. Aus der Mitte des Flusses entnommen	10. 1. 09	5 ccm einer Verd. 1:100	53	0,01 0,001 0,0001 0,00001	ja " nein "			1060	1000—9000
11	dgl.	17. 1. 09	5 ccm einer Verd. 1:100	60	0,01 0,001 0,0001 0,00001	ja " nein "			1200	1000—9000
12	dgl.	20. 1. 09	5 ccm einer Verd. 1:100	12			0,01 0,001 0,0001 0,00001	ja nein ja nein	240	100—900 (—90 000?)

Lfd. No.	Herkunft der Wasserprobe	Zeit der Entnahme	Verdunstungsverfahren		Verfahren Petruschkys		Verfahren Eijkmans		Es fanden sich also Colikeime im		
			verarbeitete Wassermenge ccm	Anzahl der Colibacillen	verarbeitete Wassermenge ccm	Coli?	verarbeitete Wassermenge ccm	Coli	bei dem Verdunstungsverfahren	bei dem Verfahren Petruschkys	bei dem Verfahren Eijkmans
13	Brücke Borenden - Lengen, 4000m unterhalb d. Einmünd. der Göttinger Abwässer. Entnahme in der Mitte des Flusses	10. 1. 09	5 ccm einer Verd. 1:10	108	0,01 0,001 0,0001 0,00001	ja "nein "			216	1000—9000	
14	dgl.	17. 1. 09	5 ccm einer Verd. 1:10	126	0,01 0,001 0,0001 0,00001	nein ja nein "			252	1000—9000	
15	dgl.	20. 1. 09	5 ccm einer Verd. 1:10	52			0,1 0,01 0,001 0,0001 0,00001	ja nein " "	104		10—90
16	Lewinsche Brücke, Leine nur mit geringen Mengen Fäkalien, noch nicht mit Hauptmenge d. Göttinger Abwässer verunreinigt	17. 1. 06	5 ccm einer Verd. 1:10	36	0,1 0,01 0,001 0,0001	? ja nein "			72	100—900	
17	dgl.	20. 1. 09	5 ccm einer Verd. 1:10	5			0,1 0,01 0,001	ja ? nein	10		10—90
18	Leinewasser, entnommen bei der Walkmühle, noch nicht mit Abwässern verunreinigt	17. 1. 09	5 ccm einer Verd. 1:10	16			1,0 0,1 0,01 0,001	ja " nein "	32		10—90

Lfd. No.	Herkunft der Wasserprobe	Zeit der Entnahme	Verdunstungsverfahren		Verfahren Petruschkys		Verfahren Eijkmans		Es fanden sich also Collikeime im Kubikzentimeter	
			verarbeitete Wassermenge ccm	Zahl der Colibacillen	verarbeitete Wassermenge ccm	Coli?	verarbeitete Wassermenge ccm	Coli	bei dem Verdunstungsverfahren	bei dem Verfahren Petruschkys
19	Schwimmbassin der Göttinger städtischen Badeanstalt	14. 1. 09 morgens Neufüllung	5	2	10,0 1,0 0,1 0,01	keine " " "			0,4	weniger als 0,1
20	dgl.	14. 1. 09 mittags	5	1			5,0 1,0 0,1	keine " "	0,2	weniger als 0,2
21	dgl.	14. 1. 09 abends	5	keine	5,0 1,0 0,1	ja nein "			weniger als 0,2	0,2—0,9
22	dgl.	15. 1. 09 morgens	10	1	10,0 1,0 0,1 0,01	ja ? nein "			0,1	0,1—0,9
23	dgl.	15. 1. 09 mittags	5	1			5,0 1,0 0,1 0,01	nein " " "	0,2	weniger als 0,2
24	dgl.	15. 1. 09 abends	5	keine	5,0 1,0 0,1 0,01	nein " " "			weniger als 0,2	weniger als 0,2
25	dgl.	16. 1. 09 morgens	5	2 (k. Indol)	5,0 1,0 0,1 0,01	nein ja nein (k. Indol)			0,4	1—9
26	dgl.	16. 1. 09 mittags	5	1	0,1 0,01 5,0 1,0 0,1 0,01	nein " nein " nein " "			0,2	weniger als 0,2

Lfd. No.	Herkunft der Wasserprobe	Zeit der Entnahme	Verdunstungsverfahren		Verfahren Petruschkys		Verfahren Eijkmans		Es fanden sich also Coli-keime im Kubikzentimeter		
			verarbeitete Wassermenge ccm	Zahl der Coli-bacillen	verarbeit. Wassermenge ccm	Coli?	verarbeit. Wassermenge ccm	Coli	bei dem Verdunstungsverfahren	bei dem Verfahren Petruschkys	bei dem Verfahren Eijkmans
27	Schwimmbassin der Göttinger städtischen Badeanstalt	16. 1. 09 abends	5	keine	5,0 1,0 0,1 0,01	ja "nein " nein			weniger als 0,2	1—9	
28		17. 1. 09 morgens Neufüllung	5	keine	5,0 1,0 0,1 0,01	" " " nein			weniger als 0,2	weniger als 0,2	
29		18. 1. 09 morgens	5	keine	5,0 1,0 0,1 0,01	ja " " nein			weniger als 0,2	1—9	
30		18. 1. 09 mittags	5	7		5,0 1,0 0,1 0,01	ja " " nein			1,4	1—9
31	dgl.	18. 1. 09 abends	5	2	5,0 1,0 0,1 0,01	" " " nein			0,4	1—9	
32	dgl.	19. 1. 09 morgens	5	keine	5,0 1,0 0,1 0,01	ja " " nein			weniger als 0,2	1—9	
33	dgl.	19. 1. 09 mittags	5	keine	5,0 1,0 0,1 0,01	" " " nein			weniger als 0,2	10—90 (?)	
34	dgl.	20. 1. 09 abends	5	keine	5,0 1,0 0,1 0,01	ja " " nein			weniger als 0,2		0,1—0,9

werden; vergl. auch Tab. IV. Auf den übrigen Nährböden verhielten sich die durch Fuchsinglanz ausgezeichneten Kolonien stets wie Coli-Bacillen. Dagegen enthielten Kolonien ohne Fuchsinglanz niemals Bakterien der Coli-Gruppe. Der Endo-Nährboden wurde übrigens auch in neueren Untersuchungen von Ferreira, Horta und Paredes (21) als zur Coli-Diagnose vorzüglich geeignet befunden. Allerdings verhalten sich die im Darm von Säugetieren und Vögeln sich findenden Coli-Bacillen auf der Endo-Platte genau wie die aus menschlichem Kot gezüchteten; vergl. Tab. II und Ferreira, Horta und Paredes (22). Aber auch die flüssigen Nährböden ermöglichen in dieser Beziehung keine Differentialdiagnose. Dagegen konnten gramnegative Stäbchen, welche aus dem Darm von Kaltblütern, wie Fischen und Fröschen sowie von Regenwürmern gezüchtet wurden, auf der Endo-Platte weder bei 41° noch bei 37° zur Entwicklung gebracht werden, eine Beobachtung, welche sich mit den Resultaten Bettencourts (23) deckt.

Tabelle IV.

Indolreaktion war positiv bei typisch auf Endo gewachsenen Coli.

Herkunft	Coli gezählt im ganzen	Davon Coli auf Indol	
		untersucht	positiver Befund
Wasserleitung (30 ccm)	69	32	32
Wasserleitung (40 ccm)	76	24	23
Schwimmballenwasser (50 ccm)	87	48	48
Schwimmballenwasser (50 ccm)	90	13	13
Leinekanalwasser	180	31	31
Abwasser	96	12	11
Quelle nach Regengüssen	21	11	11
		171	169
	mehr als	= 98 Proz.	

Schließlich muß sich das Verdunstungsverfahren noch zwei Einwände gefallen lassen, welche die Quantität der zu verarbeitenden Wasserprobe betreffen. Von manchen Vertretern der Ubiquitätslehre, so z. B. v. Weissenfeld, wird nämlich die Ansicht vertreten, daß sich in jedem Wasser Coli-Bacillen finden, wenn man nur genügende Menge, etwa 1 Liter, untersuche. Demgegenüber ist zunächst zu betonen, daß andere Autoren, z. B. Kaiser, auch bei Verarbeitung derartiger Mengen durchaus nicht in allen Wässern Coli-Bacillen fanden. Ebenso zeigten sich bei den Untersuchungen Petruschkys, Eijkmans und Christians viele Wässer frei von Coli-Bacillen, auch wenn 100 und mehr ccm verarbeitet wurden. Es ist also durchaus nicht bewiesen, daß die Untersuchung größerer Wassermengen stets Coli-Bacillen finden läßt, wo die Verwendung kleinerer Quantitäten versagte. Aber auch abgesehen davon, dürfte wohl in der Praxis auch die Verwendung von 5—10 ccm Wasser genügen. Ein Wasser, welches in 10 ccm keine Coli-Bacillen enthält, bietet doch wohl eine gewisse Gewähr, daß es nicht durch Fäkalien verunreinigt ist. Christian ist der Ansicht, daß „für den praktischen Zweck ein Versuch mit 10—20 ccm vollständig ausreichen würde, einmal deswegen, weil er niemals gesehen hat, daß in einer größeren Zahl von Kubikzentimetern noch Coli-Wachstum aufgetreten wäre, wenn in 1 ccm

keins mehr zu konstatieren war, und andererseits weil eine Untersuchung von Clark und M'Gage (bei Christian zitiert) gezeigt hat, daß mit dem Verschwinden der Coli-Bakterien aus 1 ccm Wasser die Verunreinigung (es handelte sich um Infektion mit Typhusbacillen durch Vermittlung des Wassers), aufgehört hatte. Das *Bacterium coli* entwickele eben auch bei niederer Temperatur und mäßigen Nahrungsbedingungen noch so viel Wachstumsenergie, daß es in 1 ccm Wasser gefunden werden müsse, wenn es nur in der den geringsten Grad der Verunreinigung anzeigenden Menge vorhanden sei.“

Das Verdunstungsverfahren ist endlich auch insofern begrenzt, als bei Vorhandensein von mehr wie 100 Coli-Keimen im Kubikzentimeter die Platte derart von Coli-Kolonien übersät ist, daß eine exakte Zählung schwierig ist, zumal man die Platte nicht auf einer genau eingeteilten Unterlage auszählen kann, sondern zur Erkennung des Fuchsin-glances sich die Betrachtung der Platte unter verschiedenem Licht-einfall empfiehlt. Außerdem kommt es leicht vor, daß bei zu großer Anzahl der Coli-Keime die Platte diffus gerötet wird und der Fuchsin-glantz der einzelnen Kolonie weniger hervortritt. Es empfiehlt sich daher, wenn man mehr wie 100 Coli-Keime im Kubikzentimeter vermutet, eine Verdünnung zu verdunsten. Wie aus Tabelle III hervorgeht, kommt eine solche Verdünnung nur in Betracht bei stark verunreinigten Wässern. Im allgemeinen übersteigt auch in offenen Wässern der Coli-Gehalt nicht 100 im Kubikzentimeter, vorausgesetzt, daß nicht eine frische Verunreinigung mit Fäkalien stattgefunden hat.

Alles in allem, dürften der Methode des quantitativen Coli-Nachweises mittels Verdunstung des betreffenden Wassers auf Endo-Platten gegenüber der Verwendung flüssiger Nährböden gewisse Vorteile nicht abzusprechen sein. Insbesondere empfiehlt sie sich zur raschen Orientierung, ob bei dem betreffenden Wasser Bedenken vorliegen oder nicht. Das Resultat ist bereits nach 20 Stunden da, während die Methode der Keimzählung mehrere Tage beansprucht. Zweitens ist sie auch anwendbar bei Wasserproben, welche der Untersuchungsstelle nicht vorschriftsmäßig eingesandt wurden (cf. Tabelle V). Drittens wird sie von Wert sein, bei der Beaufsichtigung von Wässern, wenn z. B. nach starken Regengüssen, Erhöhung des Grundwasserstandes etc. Verunreinigungen zu befürchten sind. Es sei in dieser Beziehung auf die Beobachtungen Wolfs (24) aufmerksam gemacht. Endlich dürfte die Methode bei der Kontrolle von Filtrierwerken und Schwimmbädern gewisse Dienste leisten.

Tabelle V.

Coli: Keimzahl im Schwimmbassinwasser (im Laborat. gestanden).

Dasselbe Wasser untersucht	Coli auf Endo pro 10 ccm	Keimzahl pro Kubikzentimeter
6. August	17	4320
7. „	6	6100
8. „	2	1640

Das Verhalten der Keimzahl entspricht den bereits bekannten Verhältnissen (nach Freise etc.).

Verhalten der Coli und Keimzahl in einem geklärten Abwasser (Hedemünden), das im Laboratorium stand.

Wann?	Coli			Keimzahl pro Kubik- zentimeter
	Verdünnung	Endo	pro Kubik- zentimeter	
Sofort	$\frac{1}{100}$	320	32 000	475 000
Sofort	$\frac{1}{500}$	67	33 500	470 000
Sofort	$\frac{1}{1000}$	32	32 000	400 000
Nach 2 Tagen (Nachfäulnis)	$\frac{1}{500}$	60	30 000	900 000
Nach 4 Tagen (Wasser geruchlos)	$\frac{1}{100}$	26	2 600	450 000
Nach 7 Tagen	$\frac{1}{10}$	20	200	66 000
Nach 9 Tagen	$\frac{1}{3}$	76	120	55 000
Nach 11 Tagen	2 ccm	64	32	40 000

Coli vermehren sich also nicht, wie die Keimzahl. Dieselbe Erscheinung beim Badewasser.

Bei der Prüfung des im vorstehenden beschriebenen Verfahrens wurde unter anderem auch das Wasser des Leineflusses benutzt, und zwar vor und nach seiner Verunreinigung mit den Göttinger Abwässern. Die Lokalverhältnisse sind bereits in einer Arbeit von Fricke (25) beschrieben; auch die Art der Entnahme wurde diesmal ähnlich bewirkt. Es wurde bereits von mehreren Autoren das Verhalten der Coli-Bacillen in verunreinigten Flußläufen untersucht, so von Hammerl (26), Jordan (27), Kisskalt (28), Brezina (28) u. a. Doch dürfte die Frage noch nicht geklärt sein. Auch aus vorstehenden Versuchen lassen sich wohl

Tabelle VI.

Entnahmeort	27. Dez. 1908 Frost, Coli im Kubikzentimeter	10. Jan. 1909 Tauwetter		16. Jan. 1909 vorher Regen		20. Jan. 1909 Frost	
		Coli im Kubik- zentimeter	Keim- zahl	Coli im Ku- bikzentimeter	Keim- zahl	Coli im Ku- bikzentimeter	Keim- zahl
Walkmühle 4000 m oberhalb Ein- mündung der Göttinger Abwässer	2,8	.	.	32	71 700	9	10 200
Lewinsche Brücke 60 m oberhalb etc.	12,6	.	.	72	103 800	10	4 700
5 m unterhalb Einmündung der Ab- wässer	5000	.	.	860	120 000	1920	.
200 m unterhalb etc.	800	680	150 000
1160 m unterhalb etc. (kurz vor Ein- mündung der Grone)	.	.	.	500	280 000	240	.
1530 m unterhalb etc. (Eselstieg)	.	1060	44 800	1200	127 000	240	148 000
4000 m unterhalb etc. (Bovenden)	.	216	29 000	252	118 000	104	28 800
20 000 m unterhalb (kurz vor Ein- mündung der Harste)	.	12	1 000
20 000 m unterhalb etc. (kurz nach Ein- mündung der Harste)	.	6	4 000
22 000 m unterhalb Einmündung der Göttinger Abwässer (Nörten) (zwischen Einmündung der Harste und Nörten nimmt die Leine mehrere Bäche auf, in denen aber keine erheblichen Mengen Coli gefunden wurden)	.	29,6	14 000

kaum weitere Schlüsse ziehen. Da dieselben jedoch vielleicht in Verbindung mit weiteren Untersuchungen den einen oder anderen Anhaltspunkt für das Verhalten der Coli-Keime in verunreinigten Flüssen bieten können, so seien sie in Tabelle VI kurz zusammengestellt.

Des weiteren wurden zur Prüfung des Verdunstungsverfahrens Proben aus dem Schwimmbassin der Göttinger Badeanstalt benutzt. Bezüglich der Lokalverhältnisse sei auf die Inaug.-Dissertation von Freise (30) verwiesen, der auch die Literatur über die bakteriologische Beurteilung von Schwimmbassinwasser bespricht. Bemerkt sei, daß mit dem Zirkulationswasser täglich etwa 18 cbm frisches Wasser dem Bassin zugeführt werden, und daß Fußbadewannen, Brausen und Bidets zur Verfügung stehen. Die Besuchszahl betrug am

14. Jan. 1909	241	Personen
15. " "	242	"
16. " "	347	"
17. " "	146	"
18. " "	289	"
19. " "	177	"
20. " "	160	"

Die quantitative Bestimmung der Coli-Bacillen in Schwimmbädern wurde bisher noch wenig ausgeführt. Außer der Arbeit von Selter (31) konnten keine Angaben darüber gefunden werden. Wenn man überhaupt aus den wenigen in Tabelle III zusammengestellten Versuchen einen Schluß ziehen kann, so ist es der, daß eine hochgradige Verunreinigung des Bassins mit Coli-Bakterien nicht konstatiert werden konnte. Es wurden insbesondere viel geringere Werte erhalten, wie sie von Selter gefunden wurden.

Zum Schlusse möchte ich nicht verfehlen, meinem früheren hochverehrten Chef, Herrn Geheimrat v. Esmarch, für die Anregung zu vorstehender Arbeit und die mir erteilten Winke meinen verbindlichsten Dank abzustatten. Ebenso gestatte ich mir, auch an dieser Stelle Herrn Dr. Ingelfinger, welcher seinerzeit ebenfalls Untersuchungen über das Verdunstungsverfahren am Göttinger Hygienischen Institut angestellt hat und dem ich die in Tabelle II, IV und V zusammengestellten Resultate verdanke, meinen verbindlichsten Dank auszusprechen.

Literaturverzeichnis.

- 1) Kruse, Zeitschr. f. Hyg. und Infektionskr. Bd. XVII. p. 1. — Zeitschr. f. Hyg. und Infektionskr. Bd. LIX. p. 6.
- 2) Moroni, Riforma medica. 1899. No. 10. p. 111. Ref. Baumgartens Jahresbericht. 1899. p. 327.
- 3) Weissenfeld, Zeitschr. f. Hyg. und Infektionskr. Bd. XXXV. p. 78.
- 3) Paposotiriu, Arch. f. Hyg. Bd. XLI. p. 204.
- 5) Levy und Bruns, Arch. f. Hyg. Bd. XXXVI. p. 178.
- 6) Chick, Ref. Hygien. Rundschau. 1902. p. 647.
- 7) Petruschky und Pusch, Zeitschr. f. Hyg. und Infektionskr. Bd. XLIII. p. 304.
- 8) Eijkman, Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. XXXVII. p. 742.
- 9) Christian, Arch. f. Hyg. Bd. LIV. p. 356.
- 10) Kaiser, ebenda. Bd. LII. p. 121.
- 11) Neumann, ebenda. Bd. LIX. p. 174.
- 12) Ref. Hygien. Centralbl. Bd. IV. 1908. p. 16.
- 13) v. Freudenreich, Centralbl. f. Bakt. Bd. XVIII. p. 102.
- 14) Savage, Ref. Hygien. Rundschau. 1903. p. 458.
- 15) Houston, Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Ref. Bd. XXXVII. p. 33 u. 124.

- 16) Ingelfinger, Hygien. Centralbl. Bd. III. p. 527.
- 17) Marmann, Hygien. Rundschau. 1908. No. 17.
- 18) Endo, Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. XXXV. p. 109.
- 19) Bulir, Arch. f. Hyg. Bd. LXII. p. 1.
- 20) Venema, Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. XL. p. 600.
- 21) Ferreira, Horta und Paredes, Archivos do real instituto bacteriologico. Camara Pestana. T. II. Fasc. II. p. 153.
- 22) — —, ebenda. p. 203.
- 23) Bettencourt et Borges, ebenda. p. 221.
- 24) Wolf, Arbeit. aus dem Hygien. Institut Dresden. Bd. I. 1903. p. 291 (Ref. Hyg. Rundschau. 1904. p. 111).
- 25) Fricke, Vierteljahrschr. f. gerichtl. Medizin und öffentl. Sanitätswesen. 3. Folge. Bd. XXXII. 2.
- 26) Hammerl, Hygien. Rundschau. Bd. VII. p. 529.
- 27) Jordan, Journ. of Hyg. Vol. I. p. 295 (Ref. Hyg. Rundschau. 1902. p. 181).
- 28) Kiskalt, Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskr. Bd. LIII. p. 305.
- 29) Brezina, ebenda. p. 361.
- 30) Freise, Beitrag zur bakteriologischen Beurteilung des Schwimmbassinwassers. (Inaug.-Dissert.) Göttingen 1906.
- 31) Selter, Hygien. Rundschau. 1908. p. 1381.
- 32) Vincent, Ann. de l'Institut. Pasteur. 1905. p. 233 (Ref. Hygien. Rundschau. 1906. p. 531).
- 33) Winslow, Orig. Ref. Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Ref. Bd. XXXI. p. 306.

Nachdruck verboten.

Apparat zur Dunkelfeldbeleuchtung und für Ultramikroskopie.

Von **Oskar Heimstädt.**

Mit 3 Figuren.

Der Spiegelkondensor F der Firma C. Reichert in Wien, bekannter unter dem Namen Plattenkondensor, soll vor allen Dingen den Zweck erfüllen, ein leistungsfähiges Instrument in der Hand des praktischen Mediziners zu sein. Er wurde speziell für Untersuchungen von Blut und zum Studium lebender Bakterien bei Verwendung relativ schwacher Lichtquellen konstruiert. Seine einfache Form und große Lichtstärke in Verbindung mit der Möglichkeit, ihn mit jedem beliebigen, auch dem einfachsten, Mikroskope verwenden zu können, haben diesem Instrumente eine große Verbreitung besonders in ärztlichen Kreisen verschafft.

Der zuletzt angeführte Vorzug wird aber in allen den Fällen zum Nachteil, in welchen der Kondensor für Untersuchungen allgemeiner Art gebraucht oder seine Verwendbarkeit für besondere Zwecke festgestellt werden soll. Es ist hierbei erforderlich, daß man von der einen Beleuchtungsmethode schnell zur anderen übergehen kann, wie es bei dem früher beschriebenen Wechsellkondensor¹⁾ der obengenannten Firma der Fall war. Bei dem Plattenkondensor ist dieser Uebergang sehr umständlich und zeitraubend, weil der Kondensor immer erst entfernt und dann wiederum zentriert werden muß.

¹⁾ Heimstädt, Oskar, Neuerungen an Spiegelkondensoren. (Zeitschr. f. wissensch. Mikrosk. u. mikr. Techn. Bd. XXIV. H. 3.)

Ebenso macht sich der Mangel einer Abblendungsvorrichtung, wie sie der Spiegelkondensor *C* aufweist, sehr unangenehm fühlbar. Bei dem Kondensor *C* kann die Lichtzufuhr mit Hilfe einer sich nach außen öffnenden Irisblende beliebig geregelt werden, welcher Umstand besonders bei Verwendung stärkerer Lichtquellen von großem Vorteil ist. Denn die Erfahrung hat gezeigt, daß die Dunkelheit des Feldes und damit auch die Kontrastwirkung um so größer ist, je mehr sich die num. Apertur des Beobachtungsobjektivs von der des abgeblendeten Büschels entfernt.

Um die Vorteile des Wechselkondensors mit denen des Immersionskondensors *C* und des Plattenkondensors zu vereinigen, wurde eine Neukonstruktion des letzteren vorgenommen.

Die Spiegellinse wurde in gewöhnlicher Weise in eine Glasplatte gekittet und diese auf einer Metallplatte befestigt. Die Metallplatte bildete den Deckel eines sehr flachen Kästchens, in dessen Innern eine Messingscheibe drehbar angeordnet ist, deren Rand an der vorderen Seite des Kästchens hervorragt. Die Scheibe trägt am Rande Stern-

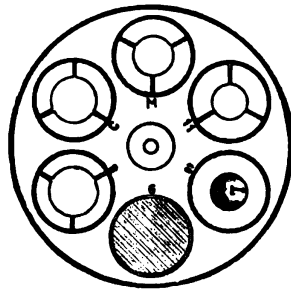


Fig. 1.

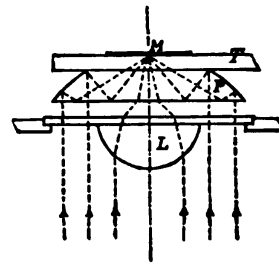


Fig. 2.

blenden von verschiedenem Durchmesser, ferner eine auf eine Glasplatte gekittete Linse *L*, deren Durchmesser gleich dem der kleinsten Sternblende ist, und eine kleine Scheibe aus mattem oder blauem Glase (Fig. 1). Eine kleine Druckfeder, die in entsprechende Einschnitte eingreift, zeigt die zentrische Stellung der Blenden bez. der Linse an.

Die Sternblende von dem kleinsten Durchmesser (8 mm) wird vor die Spiegellinse geschaltet, wenn mit Trockensystemen und relativ schwachen Lichtquellen gearbeitet werden soll. Die Blenden von mittlerem Durchmesser (9 und 10 mm) werden bei Beobachtungen mit Trockenobjektiven und stärkeren Lichtquellen (Bogen- oder Sonnenlicht) benützt, während die Blende von 11 mm Durchmesser beim Arbeiten mit Immersionssystemen¹⁾ eingeschaltet wird. Die Zahlen, welche beim Drehen der Revolverblende am Rande des Kästchens erscheinen, geben den Durchmesser der jeweilig vor der Spiegellinse befindlichen Sternblende an. Der Buchstabe *M* deutet an, daß das blaue oder matte Glas sich vor dem Kondensor befindet, in welchem Falle die einfache Spiegelbeleuchtung eingeschaltet ist. Die von dem Hohl- oder Plan-

1) Um Immersionssysteme bei der Dunkelfeldbeleuchtung mit vollem Erfolg benutzen zu können, müssen sie mit einer Rohrblende versehen sein, welche die Strahlen höherer Apertur (über 1,1) zurückhält.

spiegel des Mikroskopes kommenden Strahlen der Lichtquelle werden durch das matte Glas geschwächt und durchsetzen den als planparallele Scheibe wirkenden Glaskörper der Spiegellinse ohne nennenswerte Veränderung. Erscheint der Buchstabe *C* am Rande des Kästchens, so ist die Glasplatte mit der zentrisch darauf gekitteten Linse vor den Kondensor getreten, der Apparat wirkt jetzt als Abbescher Kondensor und kann zur Untersuchung gewöhnlicher, gefärbter Präparate gebraucht werden.

Die Figur 2 zeigt die Anordnung der beiden optischen Teile, der Spiegellinse und der vorgeschalteten Linse, und ihre Wirkungsweise. Der Strahlengang ist durch die punktierten, mit Pfeilspitzen versehenen Linien angedeutet. Die spiegelnde Fläche der parabolischen Linse *P* sammelt die vom Mikroskopspiegel kommenden äußeren Strahlen des Beleuchtungsbündels in dem Objektpunkt *M*, und zwar beleuchtet die Spiegellinse das Präparat mit Strahlen von der num. Apertur 1,4 (1,33 bei in Wasser befindlichen Objekten) bis zu der num. Apertur 0,85. Die vorgeschaltete Linse *L* hat eine Apertur von ca. 0,6; sie beleuchtet das Präparat mit Strahlen von der Apertur 0,6–0. Es fehlt also in dem vollen Beleuchtungsbündel ein Teil von der num. Apertur 0,6 bis 0,85. Bei Beobachtungen mit Immersionsobjektiven fällt dieser Umstand nicht besonders ins Gewicht, da die große Lichtstärke der Spiegellinse diesen Fehler wieder aufhebt. Nur bei Beobachtung gefärbter Präparate mit stärkeren Trockenobjektiven macht er sich durch geringere Helligkeit des Bildfeldes bemerkbar. Es ist geraten, bei Beleuchtung des Objektes mit durchfallendem Licht und vorgeschalteter Linse immer einen Tropfen Cedernöl zwischen den Objektträger *T* und die Oberfläche der Spiegellinse zu bringen. Hat das Stativ, mit welchem dieses Instrument verwendet werden soll, keinen Abbeschen Beleuchtungsapparat oder nur einen einfachen, bei welchem die Irisblende an der Kondensorfassung befestigt ist, so kann die Abblendung durch eine in den Boden des Kastens eingefügte Irisblende erfolgen, welche durch einen seitlich angebrachten Hebel betätigt wird. Ist das Stativ dagegen mit einem großen Abbeschen Beleuchtungsapparat versehen, bei welchem die Irisblende unabhängig vom Kondensor befestigt ist, so kann diese zur Abstimmung der Lichtzufuhr benutzt werden. Mit Rücksicht darauf werden von der Firma C. Reichert zwei Ausführungsformen des Universalkondensors bereit gehalten. Die eine mit Irisblende für einfache Stative ohne Beleuchtungsapparat, die andere ohne Irisblende für größere und bessere Stative.

Die den Boden des Kästchens bildende Metallplatte läuft in zwei seitlich sich fortsetzende Laschen aus (Fig. 3), welche je mit einem länglichen Schlitz versehen sind. In diesen Schlitz gleitet, um den führenden Knopf drehbar, ein Halter, der die Gestalt eines sichelförmigen Metallstückes hat. An jedem Ende dieses Metallstückes befinden sich aus Fiber gefertigte, zylinderförmige Rollen, welche sich beim Auflegen des Instrumentes auf den Tisch gegen die Ränder des letzteren legen und durch Druckschrauben fest angepreßt werden können. Die Muttern dieser Druckschrauben sind wiederum in dem Schlitz der Ausläufer beweglich und durch Knöpfe feststellbar. Für eine sichere Befestigung des Apparates auf dem Tisch ist besonders Sorge zu tragen, damit die Zentrierung des Instrumentes bei der Drehung der Revolverscheibe nicht Schaden leidet.

Das Befestigen und Zentrieren des Kondensors wird man am zweckmäßigsten auf folgende Weise vornehmen: Zuerst löst man die Klemmschrauben und schiebt die beiden Rollenhalter soweit als möglich nach außen. Dann legt man das Instrument auf den Mikroskoptisch und bringt die Achsen von Kondensor und Mikroskop nach dem Augenmaß zusammen. Nun drückt man die Rollenhalter an den Tisch, klemmt sie fest und bringt dann mit Hilfe der Druckschrauben den kleinen auf der Spiegellinse eingeritzten Kreis genau in die Mitte des Gesichtsfeldes. Das geschieht, wie beim Plattenkondensor, mit Hilfe schwacher Objektive und Okulare.

Der hier beschriebene Spiegelkondensor, welchem der Name Universal-kondensor gegeben wurde, wird in Zukunft mit Spiegellinsen von besonderer Art ausgerüstet. Die für den Plattenkondensor äußerst günstige Form der Stephenson'schen Spiegellinse wurde beibehalten,

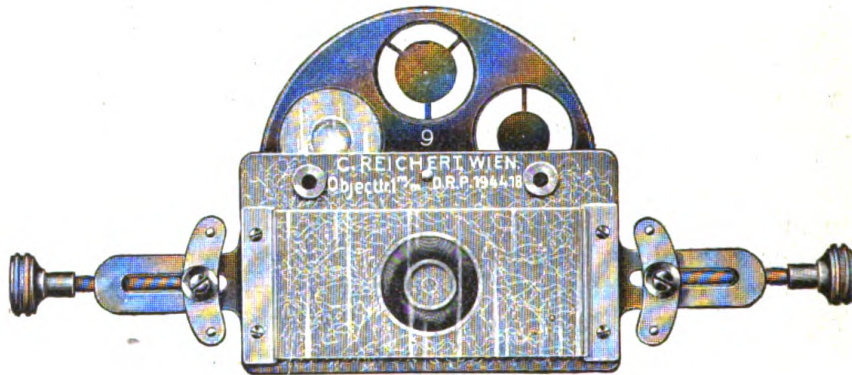


Fig. 3.

nur ist die sphärische Fläche durch eine parabolisch gekrümmte ersetzt worden.

Dadurch wird das Beleuchtungssystem frei von Aberrationen und zwar in einem solchen Maße, daß es alle anderen im Gebrauch befindlichen Hilfsmittel dieser Art übertrifft. Dieser Umstand ist aber von sehr geringer Bedeutung für die Beurteilung der Leistungsfähigkeit, insbesondere der Lichtstärke des Instrumentes. Er liefert eine Bestätigung des vom Verfasser erbrachten Beweises, daß bei der Beleuchtung im dunklen Felde der Korrektionszustand des verwendeten sammelnden Systems auf die Lichtstärke von geringem Einfluß ist, wenn Lichtquellen von größerer Ausdehnung verwendet werden. Das hier verwendete Paraboloid, dessen Krümmung von der sphärischen Spiegellinse nur wenig abweicht, liefert trotz des großen Öffnungswinkels eine verhältnismäßig scharfe Abbildung der Lichtquelle, wovon man sich durch Auflegen eines auf der Oberfläche mattgeschliffenen Objektträgers überzeugen kann. Trotzdem ist seine Lichtstärke gegenüber der sphärischen Spiegellinse nur um ein wenig höher. Es gehört das Auge eines geübten Beobachters dazu, diesen Unterschied herauszufinden.

Es war ein anderer Umstand, der für den Ersatz der sphärischen die durch parabolische Spiegellinse bei der hier beschriebenen Einrichtung bestimmend war. Schon bei dem Spiegelkondensor C hatte der praktische

Gebrauch ergeben, daß bei stärkerer Abblendung der inneren Strahlen und bei Beobachtung mit Immersionssystemen Objektträger von geringerer Dicke vonnöten waren. Das war offenbar eine Folge der sphärischen Aberrationen der Spiegellinse, da bei dieser die Brennweite der Randstrahlen kürzer als die der mittleren Strahlen ist. Infolgedessen wird der Ort der engsten Einschnürung der kaustischen Fläche, an welchem das Lichtquellenbild entsteht und der bei der Dunkelfeldbeleuchtung möglichst nahe der Präparatebene liegen soll, nach innen verschoben. Bei dem neuen Paraboloid ist dieser Uebelstand beseitigt. Die Brennweite aller achsenparallelen Strahlen ist die gleiche und die Dicke des Präparatträgers ist bei verschiedenen großen Stempelblenden stets dieselbe.

Die gewöhnlichen Plattenkondensoren werden nach wie vor mit sphärischen Spiegellinsen versehen. Ich möchte bei dieser Gelegenheit noch einmal entschieden der Auffassung entgegenreten, daß die Spiegellinse für die Zwecke der Dunkelfeldbeleuchtung ein weniger geeigneter Behelf wäre. Wie ein Vergleich mit den bisher in Verwendung befindlichen ähnlichen Mitteln ergibt, steht sie diesen in bezug auf Lichtstärke nicht nach. Nur ihre verbesserte Form, das neue Paraboloid, ist ihr in dieser Beziehung überlegen, doch, wie eigens hervorgehoben werden muß, nur um ein geringes. Von diesem Gesichtspunkte allein würde sich der Ersatz der Spiegellinse durch das neue Paraboloid kaum lohnen. Dagegen bedeutet es einen großen Fortschritt, das bei dem Universal-kondensor mit Paraboloid die Objektträgerdicke bei den verschiedenen Abblendungen dieselbe bleiben kann, wodurch es möglich wird, mit diesem Instrument ein bestimmtes Präparat mit allen zur Verfügung stehenden Beleuchtungsarten hintereinander zu untersuchen. In der Hand des Praktikers und des Forschers wird also der neue Universal-kondensor ein wertvolles Instrument darstellen, zumal es in der neuen Form aufgehört hat, ein Spezialinstrument nur für Dunkelfeldbeleuchtung zu sein.

Nachdruck verboten.

Nachtrag zu der Arbeit: Untersuchungen über die Genickstarre in der Garnison Würzburg¹⁾.

Von Stabsarzt Dr. Georg Mayer.

In den Tabellen zu meiner Arbeit über Genickstarre (Bd. XLIX. Heft 1) findet sich bei der Prüfung der v. Lingelsheim'schen Zuckerlösungen die Rubrik Traubenzucker und Dextrose. Bei erstgenanntem ist das im Handel käufliche, billige, nicht gereinigte Produkt verstanden, bei letzterer der chemisch reine Körper. Es ergab sich, daß das Handelsprodukt gut brauchbar ist, in gleicher Weise übrigens auch die sonstigen, im Handel käuflichen Zuckerarten, man ist demnach bei der Bereitung der Nährböden nach v. Lingelsheim nicht auf die chemisch reinen Produkte angewiesen, was unter Umständen praktisch wesentlich sein kann.

1) Centralbl. f. Bakt. etc. Abt. I. Orig. Bd. XLIX. Heft 1. p. 1.

Inhalt.

- Barannikoff, Johannes**, Zur Technik der Versilberung von *Spirochaete pallida* (Schaudinn-Hoffmann), p. 263.
- Barrenscheen, Hermann**, Ueber die Agglutination der Choleravibrionen, p. 261.
- Bertarelli, E.**, Beitrag zur Aetiologie der Windpocken, p. 181.
- Bocchia, Icilio**, Die Pyocyanase, p. 220.
- Bysell, Adolf**, Erwiderung auf „Zur Frage der Eier von *Culex cantans*. Antwort etc. von B. Galli-Valerio u. J. Rochaz de Jongh“, p. 203.
- Fermi, Claudio**, Ueber die antitryptische Wirkung verschiedener Tiergewebe und Tieralbuminoide, p. 225.
- Ferrara, Vincenzo**, Ueber das antigene Vermögen des Typhusbacillus sowohl in künstlicher als auch in natürlicher Kultur, p. 209.
- Galli-Valerio, Bruno**, Recherches sur la spirochétiase des poules de Tunisie et sur son agent de transmission: *Argas persicus* Fischer, p. 189.
- Gräter, Wilhelm**, Die Methämoglobinbildung in bluthaltigen Nährböden durch Streptokokken, p. 241.
- Heimstädt, Oskar**, Apparat zur Dunkelfeldbeleuchtung und für Ultramikroskopie, p. 283.
- König, H.**, Zur Frage der Fleischvergiftungen durch den *Bacillus paratyphi B*, p. 129.
- Küster, E.**, Untersuchungen über Phenostal (Karbolsäuretableten) und seine keimtötende Wirkung, p. 233.
- Kulakowsky**, Ueber die Wirkung des Magen- und Darmsaftes auf Pyocyanase, p. 215.
- Lipschütz, B.**, Antwort auf die Bemerkungen des Herrn Prof. Babes im Centralblatt für Bakteriologie. Bd. XLVIII. Heft 5, p. 178.
- Marmann**, Ein neues Verfahren zum quantitativen Nachweis des *Bacterium coli* im Wasser, zugleich ein Beitrag zum Verhalten dieses Keimes in Flüssen und Schwimmbassins, p. 267.
- Mayer, Georg**, Nachtrag zu der Arbeit: Untersuchungen über Genickstarre in der Garnison Würzburg, p. 287.
- Münden, Max**, Eine wichtige bakteriologische Aufgabe, p. 206.
- Panichi, Luigi und Porri, Giulio**, Ueber die Biologie des *Pneumococcus* von Fraenkel, p. 139.
- Rach, A. u. v. Reuss, A.**, Zur Aetiologie der Cystitis im Säuglingsalter (*Bacillus bifidus communis* und ein *Paracolibacillus*), p. 169.
- Struëff, Nic.**, Ursache des Todes bei dem akuten Milzbrande, p. 156.

Die Redaktion des „Centralblatts für Bakteriologie und Parasitenkunde“ richtet an die Herren Mitarbeiter die ergebene Bitte, etwaige Wünsche um Lieferung von besonderen Abdrücken ihrer Aufsätze entweder bei der Einsendung der Abhandlungen an die Redaktion auf das Manuskript schreiben zu wollen oder spätestens nach Empfang der ersten Korrekturabzüge direkt an den Verleger, Herrn Gustav Fischer in Jena, gelangen zu lassen.

Sarcina mucosa nova species?

Von Dr. Ernst Sauerbeck, Basel.

Mit 3 Figuren.

Das System der Bakterien hat in neuerer Zeit starke Erweiterungen erfahren, und zwar nicht nur auf Seite der Formen, die unter den verschiedensten Bedingungen ein saprophytisches Dasein führen, sondern auch, ja sogar vorwiegend, auf Seite der pathogenen. Jedermann ist der Zuwachs gegenwärtig, den die Reihe der Coli-ähnlichen Stäbchen dank den Arbeiten verschiedener Forscher in den letzten Jahren erfahren hat und noch immer erfährt, die Bereicherung ferner, die verschiedenen Gruppen durch die Studien besonders von Albrecht und Ghon über anaërobe Krankheitserreger zuteil geworden ist, dann etwa die Entdeckung des *Streptococcus mucosus* durch Schottmüller u. a. m., ganz zu schweigen von den Verdiensten der Spirochätenforschung.

Das leicht zu überblickende System, das der pathologischen Bakteriologie noch vor wenigen Jahren vollauf zu genügen schien, ist so in kurzem zu einem komplizierten Bau geworden, der besonders durch die Zwischenformen, die ja in keinem ausgereiften oder auch nur ausreifenden biologischen System fehlen, auch manche schwankenden Punkte enthält.

Um eine neue pathogene Species soll das System durch nachstehende Notiz bereichert werden.

Diese neue Species — die ich freilich nicht ganz ohne Vorbehalt aufstellen möchte (von den Gründen wird noch die Rede sein) — gliedert sich einer Gruppe an, die zwar schon lange als sehr artenreich bekannt ist, für die Pathologie aber bisher ohne Bedeutung war, nämlich der Gruppe der Sarcinen.

Es sei gestattet, der Beschreibung der neuen Sarcinenart einen kurzen Ueberblick über die Eigenschaften der bekannten voranzuschicken.

Die Sarcinen sind bekanntlich Kokken; charakteristisch ist für sie, im Gegensatz zu den anderen Kokkengruppen, die Bildung regelmäßiger Verbände, mit Anordnung der Glieder nach den drei Dimensionen, und zwar rechtwinkelig, also in Würfelform — „Paketen“! — bei mehr oder weniger großer Individuenzahl. Größe und Anzahl der Individuen in den Paketen schwankt je nach der Art; entsprechend schwanken die meisten anderen Eigenschaften. Wichtig ist für uns, daß es bei manchen Arten besonderer Kunstgriffe bedarf, um die charakteristische Form, die Pakete, zu erhalten, indem die meisten Stämme auf den gewöhnlichen Nährböden, besonders den festen, wie Mikrokokken wachsen, d. h. in regellos geballten Haufen. Lehmann empfiehlt zur Erzielung von Paketen für den Fall, daß Bouillon versagt, Heudekott. Es ist übrigens, nach eigener Erfahrung, so, daß manche Stämme auf einem und demselben Nährboden bald schönere, bald weniger deutliche Pakete zeigen, ohne daß man zu sagen vermöchte, warum.

Außer der Größe von Individuum und Paketen kommen für die Artentrennung in Betracht vor allem makroskopische Charaktere; zunächst einer, der nur Ausdruck einer der schon erwähnten mikroskopischen Eigenschaften — der Größe der Pakete — ist: die mehr oder

weniger grobe Körnung der Kolonien; dann — in erster Linie — die Farbe: es gibt rot, gelb, weiß und farblos wachsende Stämme in verschiedenen Tönen.

Die Unterscheidung von pathogenen und nicht pathogenen Arten ist bei der Gruppe der Sarcinen nur nötig, wenn man mit Lehmann den *Micrococcus tetragenus*, der früher eine Mittelstellung zwischen der Gattung *Micro*(*Staphylo*-)*coccus* und *Sarcine* innehatte, zur letzteren Gattung rechnet: Nur die „*Sarcine*“ *tetragena* Lehmann ist pathogen, ein *Coccus*, der nicht eigentliche Pakete, d. h. kubische Verbände, sondern nur Vierergruppen bildet, und auch diese nur unter bestimmten Umständen, nämlich im Tierkörper. Da uns gerade diese Form besonders nahe angeht, sei an ihre übrigen Eigenschaften kurz erinnert: Mikroskopisch: Kapselbildung im Tierkörper; makroskopisch: Kolonien wie bei *Staphylococcus albus*; keine Verflüssigung der Gelatine! Wir kommen auf die *Sarcina tetragena* zurück!

Die neue Art, die zu dieser Veröffentlichung den Anlaß gab, wurde aus Auswurf gezüchtet, der zur Untersuchung auf Tuberkelbacillen eingeliefert worden war. Zur Züchtung hatte der mikroskopische Befund geführt, der einen *Micrococcus* von der typischen Form einer *Sarcine* erkennen ließ, der schon im gewöhnlichen Fuchsin-Methylenblaupräparat durch eine außerordentlich deutliche Kapsel ausgezeichnet war. Die Züchtung ergab, unter anderen Mikroorganismen, folgendes Bakterium:

Makroskopischer Befund: Kolonien auf der Agarplatte vom Aussehen der Kolonien eines typischen *Bacterium pneumoniae* (Friedländer)¹⁾, d. h. ziemlich groß (etwa 2 mm nach 24-stündigem Wachstum bei 37°, wachsen bis zu etwa 4 mm aus), grau, manchmal mehr weißlich (die Farbe schwankte; grau war am Anfang ausschließlich vorhanden; später traten meist mehr oder weniger zahlreiche weißliche oder sogar fast rein weiße Kolonien zwischen den grauen auf; es hing dies wohl mit einem Rückgang der Kapselbildung zusammen), sehr stark schleimig (Fadenbildung bei Entfernung der eingestoßenen Nadel!), ganz kreisrund.

Mikroskopischer Befund: Sehr schöne Kokkenpakete von 8, meist 4, 8 und mehr Gliedern, mit sehr starker Kapsel (die Kapsel ist meist dicker — an einer Seite gemessen — als das ganze Paket); sie läßt sich ziemlich leicht, doch nicht ganz regelmäßig färben; schon im Methylenblau-, dann im Giemsa-Präparat nimmt sie vielfach die Farbe (in letzterem eine rötliche Komponente) an; sie wurde ferner nach der Vorschrift Johnes und nach der Kaufmanns mit Erfolg gefärbt. Die Kapsel ist auch im Dauerpräparat zu sehen. Bei schwächerer Vergrößerung erscheint sie homogen, bei starker erkennt man im Trockenpräparat eine wabige Struktur, manchmal eine dichtere innere und eine mehr lockere äußere Zone (vergl. Fig. 1).

1) Typisch nenne ich Kolonien mit Schleim(Kapsel-)bildung; man findet noch öfter die Anschauung vertreten, das *Bacterium pneumoniae* bilde nur im tierischen bzw. menschlichen Körper eine Kapsel; es schwindet die Kapselbildung ja wohl in der Mehrzahl der Fälle bei künstlicher Züchtung, meist aber doch wohl erst in späteren Generationen; es kann die Kapselbildung aber auch weiter dauern; ich habe vor Jahr und Tag aus dem Eiter eines Falles von Otitis media einen Stamm gezüchtet, der während der ganzen langen Zeit der Züchtung — anderthalb Jahre! — und zwar bei ziemlich häufigem Ueberimpfen die starke ursprüngliche Kapselbildung unverändert beibehielt.

Die Pakete erscheinen meist durch die Kapsel zu größeren strangartigen Zusammenhängen vereinigt. In diesem Fall sieht man öfters von einem Paket zum anderen fast gerade dünne Stränge ziehen, so intensiv gefärbt, wie die Bakterienleiber selbst (vergl. Fig. 2). Eine ganz sichere Deutung weiß ich für sie nicht zu geben; die wahrscheinlichste scheint mir die zu sein, daß es sich um eine Rippenbildung der angetrockneten Kapsel handelt, um Rippen, die wie Bergketten von einem Gipfel zum anderen ziehen, so die Pakete miteinander verbindend; auffallend bleibt bei dieser Erklärung der scharfe Kontur der Brücken; die Brücken sind gegen die umgebende Kapsel ganz ebenso deutlich abgegrenzt wie die Bakterienleiber selbst, so daß, wenn dies anders denkbar wäre, man auch an Bakteriensubstanz denken möchte, die sich infolge unvollständiger Teilung zwischen den Abkömmlingen eines Mutterpakets erhalten hätte.

Die Paket- wie die Kapselbildung hat sich während der ganzen Zeit der Beobachtung (etwa $1\frac{1}{2}$ Jahre) in vollem



Fig. 1.

Fig. 1. *Sarcina mucosa*, Paket aus Kultur, Trockenpräparat, nach Giemsa gefärbt, zeigt die Stärke der Kapsel und ihre Struktur im Trockenpräparat (2 Zonen, Wabenbildung!).



Fig. 2.

Fig. 2. *Sarcina mucosa* aus Kultur. Technik wie bei 1. Brücken (von der Färbbarkeit der Zellsubstanz) zwischen den Paketen.

Maße erhalten, trotzdem der Stamm nur außerhalb des Tierkörpers gezüchtet wurde. Eines geringen Nachlasses der Kapselbildung wurde gelegentlich der Besprechung des makroskopischen Befundes gedacht; sie trat erst in letzter Zeit auf, als zwischen den Uebertragungen größere Zeiträume verflossen waren (einige Wochen).

Auch die Paketbildung schien mir, besonders in der letzten Zeit, einigen Schwankungen unterworfen, indem zwar Paketbildung immer noch sehr deutlich, die Anordnung der Individuen im Paket aber hin und wieder mehr oder weniger unregelmäßig war.

Ueber chemische Leistungen ist folgendes zu sagen:

Gelatine wird nicht verflüssigt.

Keine Zuckerart wird unter Gasbildung vergoren.

Es wurden verwendet:

Mannit und Dulcit (Alkohole)

Saccharose	} Disaccharide
Laktose	
Maltose	

d-Glukose	} Monosaccharide.
Fructose (Lävulose)	
Mannose	
Galaktose	

Milch blieb unverändert.

Das **Verhältnis zum Tierkörper** ist dieses:

Die Sarcine ist pathogen für Mäuse, weiße Ratten, Meerschweinchen; nicht pathogen dagegen für Kaninchen. (Mäuse und Ratten sind nur subkutan, Meerschweinchen subkutan und intraperitoneal, Kaninchen subkutan, intraperitoneal und intravenös infiziert worden.)

Die Unempfindlichkeit der Kaninchen scheint eine absolute zu sein; die Tiere ertrugen eine Injektion von 10 ccm üppig durchwachsener junger Bouillonkultur, sogar intravenös, ohne die geringsten Störungen zu zeigen.

Andererseits scheint auch die Empfindlichkeit, beim Meerschweinchen wenigstens, an dem die meisten Versuche angestellt wurden, eine fast absolute zu sein, d. h. es sind hier schon sehr kleine Dosen tödlich:

So tötete von der Stammkultur, die noch nie den Tierkörper passiert hatte und seit fast 1½ Jahren auf den gewöhnlichen Nährböden gezüchtet worden war

1/20 ccm Bouillonkultur (von 24 Stunden)	in 13 Tagen	ein Meerschweinchen von 260 g
1/20 " " " (" 48 ")	" 10 " "	" " 245 "

Passagekulturen waren noch bedeutend virulenter; es tötete die Sarcine

nach 6maliger Passage durch das Meerschweinchen

1/20 ccm Bouillonkultur (von 24 Stunden)	in 3 Tagen	ein Meerschweinchen von 260 g,
nach 7-maliger Passage		

1/100 ccm Bouillonkultur (von 48 Stunden)	in 3½ Tagen	ein Meerschweinchen von 250 g.
---	-------------	--------------------------------

Noch größer ist die Virulenz, wenn man direkt das bakterienhaltige Exsudat eines gefallen Tieres verimpft; so tötete

1/100 Tropfen (!) (von ca. 1/30 ccm) Exsudat der 5. Passage	in 2 Tg.	ein Meerschw. v. 240 g
1/400 " " " " 6. " " 2 " " "	" "	" " 185 "

Die untere Grenze wurde wegen Mangel an Tieren nicht festgestellt; keines von den infizierten Meerschweinchen hat überhaupt überlebt.

Bemerkenswert ist der ganz allmähliche Uebergang der Infektion zur Chronizität, wenn die Dosis vermindert oder das Gewicht des Versuchstieres höher gewählt wird.

Das Gewicht (bzw. Alter) des Versuchstieres ist von großer Bedeutung; so töten

1) { 1 Tropfen Exsudat der 4. Passage	in 2 Tagen	ein Meerschweinchen von 640 g
1) { 1/5 " " " 3. " " 1 Tage	" "	" " 153 "
2) { 1/20 " " " 6. " " 14 " "	" "	" " 505 "
2) { 1/400 " " " 6. " " 2 " "	" "	" " 185 "

Mäuse wurden nur 2 injiziert:

Die erste starb mit 3 ccm Stammkulturbouillon in weniger als 2 Tagen die zweite, mit 1 Oese Exsudat von der ersten, starb in 3 Tagen.

Ich gehe auf die Infektionsversuche, da sie von theoretischem Interesse sind, an anderer Stelle noch näher ein; hier bemerke ich nur noch folgendes:

Die empfindlichen Tiere (nur am Meerschweinchen genügende Beobachtungen angestellt!) zeigen längere Zeit (mehrere Stunden) vor der

Tode Zeichen schwerer Krankheit, kauern apathisch, mit gesträubtem Haar in einer Ecke des Käfigs, sind muskelschwach, lassen sich leicht auf den Rücken legen. Der Tod tritt ohne besondere Erscheinungen ein.

Der Obduktionsbefund ist dieser: Beim Meerschweinchen

1) Makroskopisch: In der Bauchhöhle (nach intraperitonealer Injektion, öfters auch subkutan) eine beträchtliche Ansammlung einer stark schleimigen eiterähnlichen Masse; unter der Haut bei einem der Fälle mit chronischem Verlauf als extreme Veränderung ein Absceß von Taubeneigröße, mit etwa 2 mm dicker, schwartiger Wand und weißlichem, rahmkäseähnlichem, kaum schleimigem Inhalt; in der Bauchhöhle erreichte die Menge der genannten Masse meist 10–20 ccm und mehr (eine genaue Messung war unmöglich, da ein beträchtlicher Bruchteil an der Bauchwand und den Eingeweiden hängen blieb. (Die Farbe war immer blaßgelblich-grau, nie blutig.)

In mehr oder weniger deutlichen Spuren kam dieselbe Masse oder aber ein mehr durchsichtiger Schleim auch in den Brusthöhlen, selten im Herzbeutel vor. Eingeweide und Wand der serösen Höhlen waren in einigen Fällen injiziert, besonders stark das aufgerollte Netz; sonst waren, außer vielleicht einer leichten Schwellung der Milz und regionären Lymphdrüsen, keine pathologischen Veränderungen zu bemerken.

2) Mikroskopisch: Die eben geschilderten eiterähnlichen, schleimigen Massen bestanden (ebenso der mehr käseartige Inhalt des besonders erwähnten Abscesses) in der Hauptsache aus Bakterienmassen, und zwar aus schönen, wohlgekapselten Paketen, häufig trifft man tetragenus-artige Viererformen, ebenfalls nicht selten aber größere Verbände (siehe Fig. 3), zwischen den Bakterien mehr- und einkernige Leukocyten, manchmal nicht ganz spärlich, manchmal aber in sehr geringer Zahl.

Die Zellen, und zwar beide Arten, die einkernigen (makrophagen), wie die mehrkernigen (also die gewöhnlichen Zerstörer der Bakterien), besonders aber Elemente, die der Größe und Kernform nach zwischen

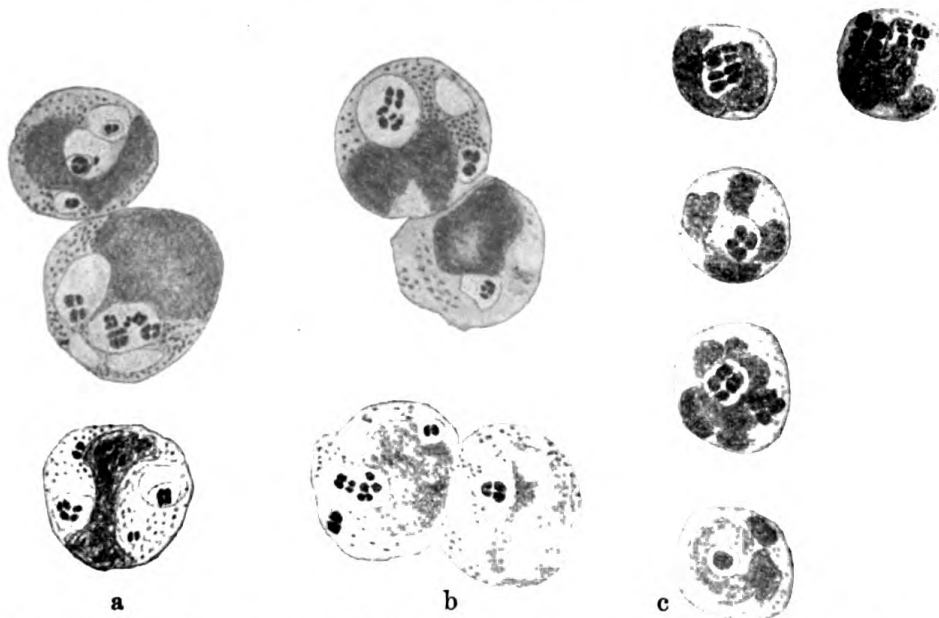


Fig. 3. Phagoeytose der *Sarcina mucosa* in der Bauchhöhle des Meerschweinchens. a und b: Zellen, nach dem Tode dem Tiere entnommen. c: 16 Stunden nach der Infektion dem lebenden Tiere entnommen. Technik nach Giemsa.

beiden stehen, dienen als **Phagocyten**, enthalten hie und da, im ganzen sehr selten, ein oder mehrere Bakterienpakete (Fig. 3).

Beim Kaninchen, das, wie gesagt, völlig refraktär ist, kam die Phagocytose im strömenden Blute zur Beobachtung. Es muß die Phagocytose hier also wohl viel leichter als beim empfindlichen Meerschweinchen zustande kommen.

Versuche über Phagocytose in vitro sind leider mißglückt.

Das Blutserum wirkt folgendermaßen auf das Bakterium ein:

Bestimmung der Serumwirkung.

Versuch I.

	Virulenter Stamm ¹⁾		Avirulenter Stamm ¹⁾	
	¹ / ₁₀₀₀ ²⁾	¹ / ₁₀₀₀₀ ²⁾	¹ / ₁₀₀₀	¹ / ₁₀₀₀₀
Citratlösung	ca. 1000	30	40	200
Kaninchenserum inakt.	„ 1000	140	240	120
„ akt.	„ 1000	800	2800	480
Meerschweinchenserum inakt.	„ 1000	680	6400	9000
„ akt.	„ 1000	1260	10000	12000

Die Begünstigung des Wachstums durch Meerschweinchenserum, insbesondere aktives, trat in einem 2. Versuch nicht zutage (die Kolonne für das inaktive Meerschweinchenserum blieb hier leer, weil das inaktive Serum sich als nicht steril erwies).

Versuch II.

Citratlösung	0/0	0/0	0/0	0/0
Kaninchenserum inakt.	160/180 ³⁾	16/0	35/60	74/90
„ akt.	160/110	7/15	5/50	100/90
Meerschweinchenserum inakt.	—	—	—	—
„ akt.	100/112	32/20	32/80	185/60

Daß die Suspension in Citratlösung kein Wachstum ergab, hängt mit dem in diesem Versuche ziemlich langdauernden Aufenthalt der Bakterien (schon vor dem Versuch!) in der keineswegs indifferenten Verdünnungsflüssigkeit zusammen (vergl. meine Arbeit über „Opsonine“ in Arch. f. Hyg. 1909).

Also nicht in der Serumwirkung, wohl aber im Verhalten der Leukocyten zeigen, nach den freilich dürftigen Beobachtungen, die beiden der Infektion gegenüber so verschiedenen Tierarten einen Unterschied.

Das Verhältnis der Kapselbildung zur Infektiosität, ein sehr aktuelles Thema, bildet den Gegenstand der erwähnten anderweitigen Mitteilung.

Ich erwähne hier nur noch, daß die Kapseln gewöhnlichen äußeren Schädlichkeiten gegenüber einen energischen Schutz zu gewähren scheinen. Ich glaube wenigstens nur auf sie die enorme Resistenz gegen Chloroform zurückführen zu können. Ich habe zweimal versucht, Bouillonkultur durch reichliche Zugabe von Chloroform (im Ueberschuß) zu sterilisieren, um die abgetötete Bakterienmasse auf Giftwirkung und Phagocytierbarkeit zu untersuchen; trotz mehrtägigem Kontakt trat aber der gewünschte Erfolg nicht ein.

Das Bakterium wird im Laboratorium von Král in Prag in dankenswerter Weise fortgezüchtet; es kann von dort durch Forscher bezogen werden, die sich der Aufgabe unterziehen wollen, die Lücken

1) Virulent bedeutet: dem Tier(Meerschweinchen-)körper durch Passage angepaßt; als avirulent ist der Originalstamm bezeichnet, der nie im Tierkörper war.

2) ¹/₁₀₀₀ bzw. ¹/₁₀₀₀₀ bedeutet: 1000- bzw. 10000-fach verdünnte Bouillonkultur.

3) Die 2 Zahlen in je einer Kolonne entsprechen dem Ergebnis, das ein kürzerer und ein längerer Kontakt von Bakterium und Serum lieferte (10 Min. bzw. ³/₄ Std.).

auszufüllen, die meine Untersuchung teils aus äußeren, teils aber auch aus Gründen bestehen lassen mußte, die in der Natur der Sache liegen, wie die Notwendigkeit immer erneuter Untersuchung, wie sie nötig ist, um die Dauerhaftigkeit der Kapselbildung, das Verhalten des Bakteriums nach allfälligem Schwinden der Kapsel (Identität mit *Sarcina tetragena*?), insbesondere auch den Zusammenhang von Kapselbildung und Virulenz festzustellen.

Ich trage noch folgende Bemerkung nach:

In der neuesten Auflage von Lehmanns Lehrbuch, p. 203, finde ich eine Angabe, wonach der Autor in angeblich normalem Sekret der Cervix uteri des Menschen eine *Sarcina tetragena* gefunden hat, die „sich nur durch einen ganz zähen, kaum verteilbaren Belag vom *Tetragenus* unterschied“. Es könnte sich wohl um dasselbe Bakterium wie in meinem Falle handeln. Ob es sich um *Tetragenus* handelt, dürfte erst die weitere Verfolgung des Wachstums mit Sicherheit erweisen. Es wird auf alle Fälle besser sein, die beiden Formen vorläufig zu unterscheiden, da die Unterscheidung manche Fragestellung bedingt, die sonst zum Nachteil unseres Wissens unterbliebe. (Als Gründe zur Identifizierung könnten angesehen werden: Auftreten tetragenusartiger Formen im Tier; Neigung, in der letzten Periode der Züchtung auf Agar mehr trockene, weiße Kolonien zu bilden, chemisches Verhalten [Mangel der Gelatineverflüssigung].)

Nachdruck verboten

The presence of tubercle bacilli in the circulating blood in tuberculosis.

By Prof. Randle C. Rosenberger, M. D., Philadelphia.

The technic for the demonstration of tubercle bacilli in the blood was as follows:

About 5 cubic centimeters of blood are withdrawn from a vein of the arm, and this is immediately placed in an equal quantity of a two percent solution of citrate of sodium in normal salt solution. The mixture is well shaken and placed in the refrigerator for twenty-four hours. At the end of this time there is an abundant sediment with the citrate solution slightly turbid. Centrifugalization immediately after mixing did not give very good results so I determined upon letting it stand for twenty-four hours. After this time I pipetted off a quantity of the sediment, made a rather thick preparation upon a new, clean glass slide, dried it upon a copper plate with moderate heat and then placed it in distilled water until complete laking of the blood resulted. At this time only a delicate film remained. This was dried and fixed through a Bunsen flame and then stained by the usual technic for tubercle bacilli. As a rule bacilli possessing the morphologic and tinctorial properties of the tubercle bacillus could be demonstrated in the first slide thus prepared, though in several cases three slides were thoroughly searched before any bacilli were found. At least thirty minutes of careful searching should be done, before a negative result is announced.

The pipettes before being used were thoroughly washed in water, then placed in pure nitric acid, and after being used were again washed,

this time in a solution of caustic soda, rinsed and again placed in pure nitric acid until ready for use. No one pipette was used on two different cases on the same day. Lately I have sterilized the pipettes at 160 C. for one hour and then placed in nitric acid before using. The syringes used for withdrawing the blood, as well as the needles, were boiled for about twenty minutes before and after using in a solution of caustic soda. The needles were kept in a solution of equal parts of lysol and glycerine and just before use were washed in sterile water. The glass piston of the syringe was annointed with glycerin, as well as the nozzle to prevent any undue adhesion of these parts. No special preparation of the patient's arm is necessary as lysol was simply applied upon the area as Wright practises in his opsonic work.

In the first few studies undertaken 10 c. c. of blood were withdrawn, then 5 c. c., and where for some unforeseen circumstance this amount could not be obtained from the patient, 2 c. c. were taken. I would recommend 5 c. c. as the proper quantity to withdraw. Intimate mixing must be made lest the blood should clot, in which case the greatest difficulty arises in demonstrating the organisms.

The cases studied up to the present time number 50. Of these five were diagnosed as acute miliary tuberculosis; two as fibroid tuberculosis; one as pneumothorax; fifteen as incipient tuberculosis; twenty-three of moderately advanced tuberculosis and three as laryngeal tuberculosis. I also had the opportunity of examining the blood from the umbilical cord of a placenta delivered from a tuberculous mother.

In every case examined tubercle bacilli were observed. Sometimes only a few were seen, but they were mostly in large numbers and clumps of 30 to 40 bacilli were not unusual, especially in the cases of acute miliary tuberculosis. In morphology most of the organisms were of the normal size, though some short and even clubbed, as well as a few very long forms were encountered. In one of these cases the pneumococcus was seen. In several cases clumps of tubercle bacilli could be clearly observed in some of the leukocytes, indicating phagocytosis.

Nachdruck verboten.

Zur Frage über die Veränderungen des Nervensystems bei der asiatischen Cholera beim Menschen¹⁾.

[Aus dem Laboratorium bei der Klinik für Geistes- und Nervenkrankheiten des Akademikers W. Bechterew zu St. Petersburg.]

Von **Sergius Michailow.**

Mit 2 Figuren.

Wenn man die pathologisch-anatomische Literatur über Cholera durchgeht, so fällt vor allem die Tatsache auf, daß die ersten Autoren hinsichtlich dieser Frage hauptsächlich und sogar ausschließlich sich mit dem Studium der pathologischen Anatomie der Gedärme, der Nieren, der Leber und des Herzens beschäftigt haben (Reinhardt, Leubuscher, Buhl, Meyer, Rudnew, Strauss, Roux, Nocard

1) Mitgeteilt in der wissenschaftlichen Sitzung der Klinik für Geistes- und Nervenkrankheiten zu St. Petersburg, den 28. November 1908, mit Demonstration der entsprechenden Präparate.

Thuillier, Klebs, Hanot, Gilbert, Rumpf, Fränkel, Kelsch, Vaillard, Sawtschenko, Romanoff, Tizzoni, Cattani, Rekowski und andere). Dieser Umstand wird natürlich einfach dadurch erklärt, daß im klinischen Bilde der Choleraerkrankung bekanntlich die stärksten und auffallendsten Symptome gerade bei diesen Organen beobachtet werden. Die genannten Autoren fanden zuweilen sehr tiefgehende Veränderungen in denselben, teils parenchymatösen, teils interstitiellen Charakters.

Die Bearbeitung der Frage über die pathologischen Veränderungen im Nervensystem begann erst bedeutend später.

Tatsächlich wurde schon damals, als Europa noch keine Choleraepidemie sah, nämlich 1820, von Jameson darauf hingewiesen, daß bei der Cholera eine Hyperämie des Gehirns und Rückenmarks und ihrer Hüllen existiert, späterhin gaben Rokitansky und Raikem ebenfalls eine Hyperämie in den Ganglien der sympathischen Nerven an.

Jedoch ist es weder diesen noch anderen Autoren derselben Zeit gelungen, irgendwelche Veränderungen im Nervengewebe zu beobachten, dabei war es vielen damals klar, daß der Symptomenkomplex der Cholera im wesentlichen durch Beeinflussung des zentralen und peripherischen Nervensystems bedingt wird. Hierdurch kann man wohl das Erscheinen von zahlreichen Versuchen in den nachfolgenden Jahren erklären, die das Ziel hatten, den Anteil des Nervensystems im Bilde der Choleraerkrankung auf rein logischem Wege zu beweisen. Solche Versuche sind mit den Namen von Markus, Willie, Lobstein, Regenhart, Axmann, Seidlitz, Maudt, Lindren, Schweikert und anderen verbunden.

Erst in den 70er Jahren erschien, soviel uns bekannt, die erste Arbeit von Iwanowsky, in der die Veränderungen in den Nervenzellen selbst bei der Cholera beschrieben werden. Iwanowsky untersuchte in dieser Beziehung die Nervenzellen der Meissnerschen und Auerbachschen Geflechte, die Ganglien der sympathischen Nerven, des Rückenmarks und Gehirns. Wir wollen uns nicht bei der Auslegung der Angaben aufhalten, die er hinsichtlich dieser Frage mitteilt, da wir es für besser halten, dieses an einer anderen Stelle zu tun, und weisen nur darauf hin, daß bis zu den 90er Jahren diese Arbeit von Iwanowsky die einzige über die von uns berührte Frage blieb.

Wir werden uns aus demselben Grunde auch nicht bei den Arbeiten von Lubimow, Popoff, Sawtschenko, Tuwim, Stomma und Tschistowitsch aufhalten, für die das Material die Choleraepidemie der 90er Jahre in Rußland lieferte.

Stomma untersuchte die Nervenganglien des Herzens und der Plexus solaris, Sawtschenko die Nervenganglien der Darmgeflechte, und beide fanden in denselben Veränderungen der Nervenzellen. Veränderungen parenchymatösen Charakters wurden von Tuwim für das Rückenmark beschrieben, was jedoch die Untersuchung des Gehirns anbelangt, so wurden hier verschiedene, einander widersprechende Resultate erhalten. Vor allen wies Lubimow darauf hin, daß die Veränderungen im Gehirn hauptsächlich einen parenchymatösen Charakter tragen. Popoff kam auf Grund seiner Untersuchungen zu dem Schlusse, daß bei der asiatischen Cholera das zentrale Nervensystem durch einen diffusen Prozeß entzündlichen Charakters befallen wird — von einem Prozeß, der sehr an die von Hayem beschriebene Form von Encephalitis hyperplastica erinnert. Die Arbeit von Tschistowitsch steht

jedoch im direkten Widerspruche zu der erwähnten Ansicht von Popoff. Der größte Teil der Arbeit von Tschistowitsch besteht eben in einer Kritik der Ansichten von Popoff, und es wird in derselben bewiesen, daß im Gehirn bei der Cholera die Hauptveränderungen sich in den Nervenzellen lokalisieren, wobei sie einen degenerativen und nekrotischen Charakter tragen. Es ist natürlich, daß infolge der so zahlreichen Arbeiten, die sich zuweilen für tiefe Veränderungen in verschiedenen Organen bei der Cholera ausgesprochen haben, beständig eine Tendenz bestand, auf die eine oder andere Weise das Wesen der Cholera-erkrankung, ihre Pathogenese zu erklären.

Von den alten Ansichten herrschte am längsten die, nach welcher der Cholerasympptomenkomplex durch qualitative Veränderungen im Blute und durch große Säfteverluste des Organismus erklärt werde.

Wir wollen uns hier nicht bei der Kritik dieser Ansicht aufhalten, weil dies augenblicklich nur von historischem Interesse ist, da jetzt von allen ein anderer Standpunkt bezüglich der Pathogenese der Cholera angenommen ist, nämlich der von R. Koch. Koch lehrte, nachdem er den spezifischen Mikroorganismus, den Choleravibrio, entdeckt hatte, daß in der örtlichen Infektionsquelle, nämlich in den Gedärmen, die Choleravibrionen ihre Toxine ausarbeiten, die nachher, nachdem sie sich in den Organismus eingesaugt haben und in das Blut eingedrungen sind, eine allgemeine Intoxikation des ganzen Organismus hervorrufen.

Diese Ansicht verneint eine Durchdringbarkeit der Darmwand für den Choleravibrio und ein Eindringen desselben in die inneren Organe. In der entsprechenden Literatur wurden diese Tatsachen jedoch auch jetzt noch beschrieben.

Der Fund der Choleravibrionen in allen inneren Organen erscheint dabei nicht als eine vereinzelte Tatsache, denn eine große Anzahl von Autoren machte in dieser Beziehung Angaben in der russischen und ausländischen Literatur.

Koch selbst entdeckte zuerst im Jahre 1889 den Choleravibrio in mikroskopischen Präparaten, nämlich in der Darmwand. Die gleiche Tatsache wurde sodann von Kühne, Hueppe, Pfeiffer, Tizzoni und Cattani beobachtet.

In den Gallenwegen und der Gallenblase sahen Nikati und Rietsch den Cholerabacillus, im Blute der Herzhöhlen sahen ihn Tizzoni und Cattani.

Vom bakteriologischen Standpunkte aus hat natürlich nicht das mikroskopische Präparat eine größere Bedeutung, sondern die Kultivierung des entsprechenden Mikroorganismus aus dem Material, das seiner Anwesenheit verdächtig ist. Und gerade in dieser Richtung gibt es noch zahlreichere Angaben von seiten verschiedener Forscher. Rapschewsky, Girode, Doyen, Fischer, Rommelaire, Diatroptoff, Rekowsky und in letzterer Zeit Sewastjanow erhielten solche Kulturen des Choleravibrio aus der Leber. Girode schied den Choleravibrio bei Kultivierung des Pankreas aus, Doyen, Rommelaire, Diatroptoff, Rekowsky und Sewastjanow bei Kultivierung der Nieren.

Doyen, Fischer, Bordoni-Uffreduzzi, Abbat, Diatroptoff, Rekowsky und Sewastjanow erhielten Kulturen des Choleravibrio aus der Milz.

Tizzoni, Cattani, Bordoni-Uffreduzzi, Abbat, Rommelaire, Diatroptoff, Rekowsky und Sewastjanow aus dem Blute und Tizzoni, Cattani und Rekowsky bei Kultivierung der Galle.

Fischer, Rommelaire und Diatroptoff gewannen den *Cholera vibrio* bei Kultivierung der Lunge.

Endlich erhielt Rekowsky eine Kultur des *Cholera vibrio* aus den Muskeln und Sewastjanow bei Kultivierung der Gland. lymphat. und des Harnes.

Indem wir im Auge haben, daß alle diese Arbeiten über die pathologisch-anatomischen Veränderungen im Nervensystem, die von uns oben angegeben worden sind, eigentlich pathologischen Anatomen, und nicht Neurologen angehören, und mit Hilfe von allgemeinen histologischen Färbungsmethoden der Präparate mit Anilinfarben angestellt worden sind, so schien es wünschenswert, von neuem eine systematische Untersuchung des Nervensystems von Menschen vorzunehmen, die an der asiatischen Cholera zugrunde gegangen sind, und zwar mit Hilfe der komplizierten und verschiedenartigen neuesten Methoden, die jetzt in der Neurologie gebräuchlich sind. Wir unternahmen mit um so größerer Lust diese Untersuchungen, da einerseits dieses Thema von unserem hochgeehrten und teuren Lehrer, dem Geheimrat, Akademiker W. Bechterew sehr empfohlen wurde und es uns schien, daß bei der Cholera die hauptsächlichsten Läsionen sich gerade im Nervensystem lokalisieren müssen, und zwar aus folgendem Grunde: Man kann kaum darüber streiten, daß alle Komplemente des Cholerasympptomenkomplexes ohne Ausnahme einen zentralen Ursprung haben, und es war daher unser Bestreben, die Veränderungen in der feinsten Struktur der Nervenzelle aufzuklären, die als anatomisches Substrat des Cholerasympptomenkomplexes dienen. Außerdem hat eine große Anzahl von Autoren (Esquirol, Brierre de Boismont, Cazeaux, Chéron, Bazin, Rayer, Krempin, Wasiljew, Griesinger, Morel, Kraepelin, Neumann, Delasieuvre, Müller, Tardieu, Bull, Guslain, Mesnet, Van Holsbeek, Lewtschatnik, Greidenberg und andere) darauf hingewiesen, daß öfters sich an eine Choleraerkrankung verschiedene Psychosen anschließen, die sich in Form einer maniakalen Erregung von Melancholie, oder eines stuporösen Zustandes entwickeln.

Für den Neurologen sind solche Angaben, die von Anschwellung und Trübung des Protoplasmas der Nervenzelle, oder einer mehr oder weniger intensiven Färbung des Kernes usw. reden, von geringer Bedeutung. Gerade solche Angaben werden in den oben erwähnten Arbeiten mitgeteilt und sind jetzt schon ohne Interesse, wo wir imstande und deshalb verpflichtet sind, die feinste Struktur der Nervenzelle selbst und die Veränderungen dieser Struktur bei diesen oder jenen anormalen und pathologischen Verhältnissen zu studieren. Uns interessiert jetzt das Studium der Organe der Nervenzelle, die beim jetzigen Stande der Wissenschaft auf folgende Weise betrachtet werden: Einige von ihnen als Stellen, in denen der komplizierteste Prozeß, der Nervenprozeß, stattfindet (als dieses Organ erscheint der neurofibrilläre Apparat der Nervenzelle), andere als Anhäufung von Nervenenergie (als dieses Organ erscheint die tigroide oder chromatophile Substanz der Nervenzelle), die dritte als das Nahrungs- oder, wenn man sich so ausdrücken könnte, als das gastrovaskuläre System der Nervenzelle (als dieses Organ erscheinen Holmgrens Organe oder die Trophospongien) usw.

Von uns wurde ein großes Material von eben gestorbenen Cholera-kranken bei der schwindenden Epidemie gesammelt, wobei dieses ganze Material von Leichen 45 Minuten bis 2 $\frac{1}{2}$ Stunden nach dem Tode entnommen wurde.

Wir haben erst seine Bearbeitung unternommen, und wollen in der vorliegenden kleinen Arbeit gar nicht über die mikroskopischen Bilder dieser Präparate reden, sondern werden uns bei einer ganz anderen Tatsache aufhalten.

Indem wir zum Studium der feinsten Struktur des zentralen Nervensystems bei der Cholera übergangen, hatten wir infolge der Meinung der meisten Forscher über die Undurchdringbarkeit der Darmwand für den Choleravibrio nur eine schwache Hoffnung, in unseren Präparaten aus dem zentralen Nervensystem des Menschen diese Vibrationen zu erblicken.

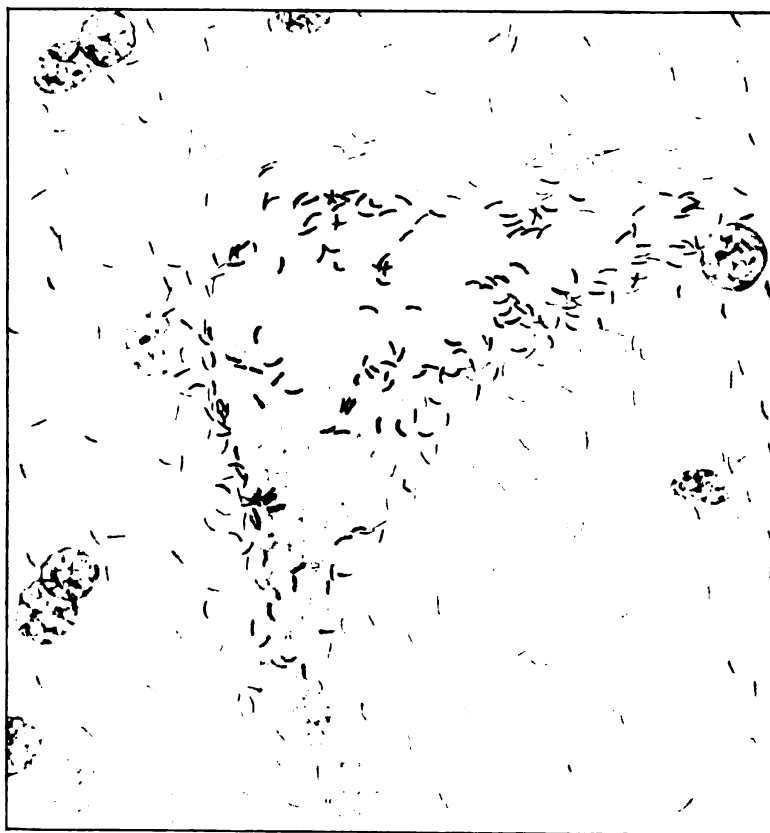


Fig. 1. Eine Nervenzelle des Rückenmarks des Menschen (aus der lateralen Zellengruppe auf der Höhe des VII. Cervicalsegmentes). Leitz Oelimm. $\frac{1}{12}$ Ok. 4. Ausführliche Erklärung im Text. Toluidinblaufärbung.

In den letzten Tagen des November haben wir aber Präparate erhalten, die auf den beistehenden Figuren genau abgebildet sind und die wir dem Urteil des Lesers unterziehen. Auf Fig. 1 ist eine Nervenzelle des Rückenmarks abgebildet, die auf die tigroiden Körperchen von Nissl gefärbt war. Auf dem Präparat erscheint sie von hellblauer Farbe, dabei diffus gefärbt.

Kein Körperchen von Nissl ist in ihr zu bemerken, jedoch ist um sie herum, in dem pericellulären Raum, auch um die anderen Zellen und längs dem ganzen Präparat eine große Anzahl von Mikroorganismen sichtbar. Viele von ihnen haben die typische Form des Choleravibrio, andere sind etwas an den Enden aufgedunsen usw.

Dieses sind Präparate des Rückenmarks, welches von einem Cholera-kranken stammte, wobei nur 45 Minuten zwischen seinem Tode und der Sektion verlaufen waren.

Hier eine kurze Krankengeschichte:

Peter Wassiljew trat ins Krankenhaus in der Nacht vom 13. auf den 14. Sept. 1908 ein. Starb um 9 Uhr 45 Minuten am 18. Sept. 1908. Verblieb im Krankenhaus 5 Tage, 25 Jahre alt, Cholera asiatica. In der ganzen Zeit der Erkrankung schwankte die Temperatur von 36,8° bis 34,3° C. Lebenssymptome waren eingefallene Augen, schwacher Puls bis zum völligen Schwund, dumpfe Herztöne, kalte Extremitäten, schwache Stimme, starker Durchfall, Erbrechen, Krämpfe, Anurie, tiefes Atmen, Cyanose, kalter klebriger Schweiß, Unbeweglichkeit des Blickes, Mattigkeit, beständiges Stöhnen.

Auf Figur 2 ist ein Präparat aus dem Gehirn abgebildet, wo eben solche Mikroorganismen sichtbar sind, wie im Rückenmark. Dieses sind Präparate von einer anderen Choleraleiche.

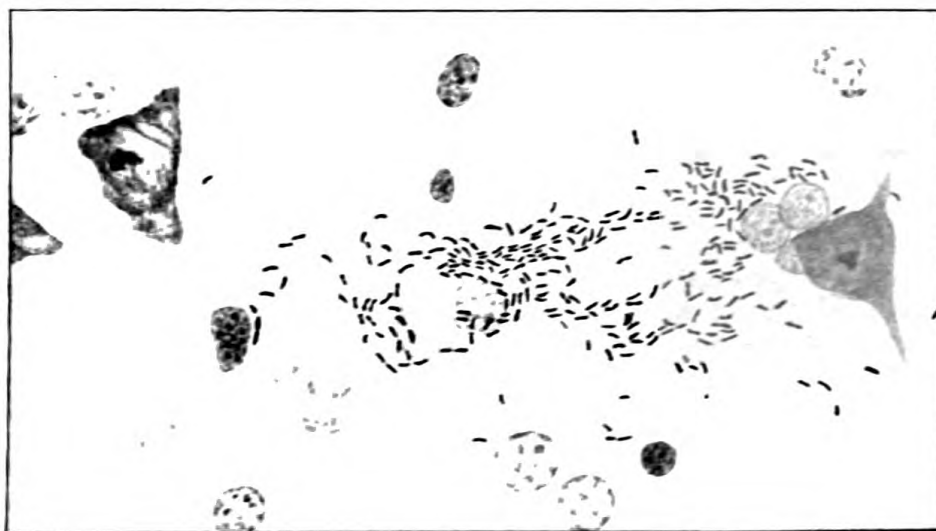


Fig. 2. Ein Schnittpräparat des Gehirns des Menschen (aus der Gyrus centralis ant.). Leitz Oelimm. $\frac{1}{12}$ Ok. 2. Ausführliche Erklärung im Text. Toluidinblaufärbung.

Hier ihre kurze Krankengeschichte:

Irina Wasiljewa trat ins Krankenhaus am 19. Sept. 1908 ein. Starb um 7 Uhr 45 Minuten morgens am 20. Sept. 1908. Verblieb im Krankenhaus 1 Tag, ist 46 Jahre alt. Cholera asiatica. Wurde am 19. Sept. 1908 morgens krank, bekam Erbrechen und Durchfall. Im Krankenhaus war die Temperatur 36,2—36,9°. Von Symptomen sind vermerkt: Schwinden des Pulses, Erkaltung der Extremitäten, Erbrechen, Durchfall und Krämpfe.

Die Färbung der Schnitte aus dem Rückenmark und Gehirn, die sogleich den eben erwähnten Schnitten nachfolgte, wurde nach Gram vollzogen und ergab folgendes: Keiner der genannten Mikroorganismen erscheint gefärbt auf dem Präparat, wogegen die nachfolgenden Schnitte bei Färbung nach Nissl mit schwacher Lösung von Toluidinblau von neuem dasselbe Bild zeigen, das oben beschrieben und auf den Figuren 1 und 2 abgebildet ist. Diese Tatsache stimmt bekanntlich mit der Ansicht überein, daß wir es in diesem Falle mit dem Choleravibrio zu tun haben, und jedenfalls spricht nichts gegen diese Vermutung.

Für eine solche Vermutung spricht die Tatsache, daß im Anfange der 90er Jahre Rekowsky den Choleravibrio bei Kultivierung des

Rückenmarks und des Gehirns, die von frischen Choleraleichen genommen, waren, ausschied.

Tizzoni und Cattani erhielten eine Kultur des Choleravibrio bei Kultivierung der Subarachnoidalflüssigkeit, außerdem erhielt Rekowski ebenfalls eine Kultur des Choleravibrio bei Kultivierung der Cerebrospinalflüssigkeit.

Wenn jedoch für unsere Vermutung für die Anwesenheit von Choleravibrionen im zentralen Nervensystem somit zwei notwendige Beweise, die morphologische Aehnlichkeit der Mikroben und ihre Kultivierung, existieren, so fehlt doch augenblicklich noch ein dritter Beweis, ohne welchen die zwei erwähnten sich noch nicht als genügend erweisen, um diese Vermutung in eine streng wissenschaftliche Tatsache zu verwandeln. Es ist noch notwendig, wie bekannt, eine typische Infektion eines Tieres durch diese Kultur zu erzielen. Wir haben die Absicht, in Zukunft die in dieser Beziehung noch bleibenden Lücken auszufüllen, augenblicklich aber, wo die Epidemie beinahe erloschen ist, wäre es schwierig, dieses zu vollbringen. In der Tat waren schon Versuche gemacht worden, Kulturen aus dem Rückenmark und der Cerebrospinalflüssigkeit der Choleraleiche zu erhalten, es wurden jedoch negative Resultate erhalten.

Es handelte sich in diesen Fällen jedoch um Choleraleichen, die in einem Falle über 6 Stunden nach dem Tode, in einem anderen 25 Stunden nach dem Tode genommen wurden, deswegen waren natürlich negative Resultate in Anbetracht der sauren Reaktion zu erwarten. Frischere Leichen zu erhalten, ist uns bis jetzt zu unserem Bedauern noch nicht gelungen.

Unsere Vermutung trifft unter anderem mit der Tatsache zusammen, daß es noch niemand bis jetzt gelungen ist, den Choleravibrio aus dem Blute eines Cholerakranken während seines Lebens auszuschcheiden.

Jedoch auch diese Tatsache erweist sich als nicht absolut: Tizzoni und Cattani gaben ihrerzeit an, daß sie einen Choleravibrio im Blut von einem lebendigen Cholerakranken beobachtet hatten. Andererseits fand man noch vor verhältnismäßig kurzer Zeit keine Typhusbacillen im Blute der Typhuskranken, während augenblicklich die Bakteriämie beim Typhus kaum noch bestritten wird. Außerdem wurden bekanntlich im Blute von verschiedenen lebendigen Tieren, die mit Cholera infiziert wurden, von einer großen Zahl von Forschern Choleravibrionen gefunden (Babes, Lustig, Vincenzi, Hueppe, Metschnikoff, Sobernheim, Koch, Hammerl, Nicati, Rietsch, Ermengem, Finkler, Prior, Fischer, Watson-Cheyne, Tizzoni, Cattani und andere).

Wir haben die Absicht, eine Erklärung des Umstandes zu geben, daß im Blute des lebenden Cholerakranken außer Tizzoni und Cattani keiner Vibrionen gefunden hat, vorher möchten wir jedoch bei folgenden Tatsachen stehen bleiben:

Beim ersten unserer Kranken, bei dem die angegebenen Mikroorganismen im Rückenmark entdeckt worden sind, erweisen sich die Mikroorganismen nicht diffus auf der ganzen Strecke des Rückenmarks verteilt. Im Gegenteil, die Lage dieser Mikroorganismen ist eine rein herdförmige, auf einigen Segmenten des Rückenmarks sind sie vorzufinden, wogegen andere Segmente von ihnen frei sind.

Dabei fällt folgender Umstand auf: Dort, wo bei den Zellen Schwärme dieser Mikroorganismen liegen, bleiben von diesen Zellen bei Färbung derselben auf die tigroiden Körperchen Nissls nur die Schatten der Zellen sichtbar, wobei dieselben hellblau gefärbt sind und kein Nisslsches Körperchen sichtbar ist.

Andererseits erhält man in demselben Rückenmark von derselben Leiche, jedoch auf der Höhe anderer Segmente, dort, wo wir keine von den erwähnten Mikroorganismen finden, bei Färbung nach Nissl ein großartiges Bild der Nisslschen Körperchen in den Nervenzellen.

Das Zusammentreffen dieser beiden Tatsachen erscheint uns keineswegs zufällig, und wir bringen dieselben in einen kausalen Zusammenhang. Diese Nisslschen Körperchen oder die chromatophile Substanz der Nervenzelle wird beim jetzigen Stand der Wissenschaft, wie schon oben erwähnt, für eine Anhäufung der Nervenenergie der entsprechenden Zelle gehalten.

Die Anwesenheit der demonstrierten Mikroorganismen in diesen Zellen bedingt eine intensive, starke Erregung derselben, da die Toxine in diesem Fall eine direkte Wirkung auf diese Zellen haben.

Die Erregung dieser Zellen durch einen solchen intensiven Reiz kann nicht anders verstanden werden, als durch eine maximale Erregung. Um diese maximale Erregung zu unterhalten und verwirklichen, ist die Nervenenergie ungenügend, die in jedem entsprechenden Momente in der Zelle gebildet wird, und es wird alles vorrätige Material verbraucht, es tritt Verbrauchung der Nisslschen Körperchen ein.

Alle diese Mutmaßungen können nur dann mit der Wirklichkeit in Uebereinstimmung sein, wenn man annimmt, daß die demonstrierten Mikroorganismen ins Rückenmark noch beim Leben eingedrungen sind, die beschriebene Tatsache stellt jedoch keine postmortale oder agonale Erscheinung vor.

Landsteiner, Austerlitz, Slawyk und andere sind geneigt anzunehmen, daß die agonale Infektion überhaupt äußerst selten erfolgt. Nach der Ansicht von Opitz, Löw, Canon und anderen muß sie jetzt überhaupt für gar nicht bewiesen gehalten werden.

Trombetta beschäftigte sich speziell mit der Aufklärung der Frage darüber, nach welcher Zeit nach dem Tode die Bakterien sich in den Organen des ganzen Körpers zu verbreiten anfangen, und er bestimmt diese Zeit auf 16—19 Stunden. Sewastjanow verlängert diesen Zwischenraum noch.

Endlich spricht in letzter Zeit sich Sewastjanow für eine vitale Verbreitung der Cholerabacillen in den Organen aus folgenden Gründen aus: 1) Auf Grund einer Analogie mit dem Abdominaltyphus. 2) Auf Grund dessen, daß die großen Veränderungen bei der Cholera im Blutbestand nicht durch den Durchfall allein, sogar im Zusammenhang mit der Vergiftung des Darmkanals, erklärt werden können. 3) Auf Grund des Fehlens genügender Angaben über eine toxische Vergiftung aus dem Darmkanal, da der Choleravibrio keine Exotoxine ausscheidet, und endlich 4) auf Grund der Unmöglichkeit, sich den Mechanismus der Bildung der Antikörper im Blut ohne vitales Eindringen der Mikroben ins Blut zu erklären.

Es scheint uns mit großer Wahrscheinlichkeit, daß für ein vitales Eindringen der Vibrionen ins zentrale Nervensystem gerade die Tatsache spricht, die wir soeben beschrieben haben, nämlich das Verschwinden der Nisslschen Körperchen in den Nervenzellen des Gehirns.

Wir könnten hier eine lange Reihe von Forschern anführen, durch deren Arbeiten augenblicklich die Tatsache bestimmt festgestellt ist, daß wie der neurofibrilläre Apparat der Nervenzelle, ebenso auch seine chromatophile Substanz gar keine Veränderungen erleiden, wenn auf dieselben irgend ein schädliches Agens während kurzer Zeit einwirkt; dazu ist wenigstens ein Tag notwendig.

Jetzt müssen wir noch einige Mutmaßungen darüber aussprechen, weswegen es nicht immer gelingt, eine Kultur der Choleravibrionen bei Kultivierung aus vollkommen frischen Organen zu erhalten, und auch zu erklären, warum keiner diese Vibrionen im Blut lebender Cholera-kranker beobachtet hat.

Ad 1. Die Tatsache, daß die Choleravibrionen, wie wir gezeigt haben, eine äußerst deutlich ausgeprägte herdförmige Lagerung haben, erklärt, unserer Meinung nach, in genügendem Maße den ersten Umstand: Eine Kultur wird aus einem Organ nur dann erhalten, wenn das Material in Form von Stückchen eines Organes gerade zufällig einen Vibrionenherd enthält. Wenn die Kultivierung mittels einer Platinschlinge gemacht wird, so muß man, um ein positives Resultat zu erlangen, zufällig auf diesen mikroskopischen Herd treffen.

Ad 2. Der Umstand endlich, daß die Choleravibrionen nicht im Blut lebender Kranken sich befinden, wird, wie es uns scheint, auf folgende Weise erklärt: Bekanntlich wird beim Typhus in der ersten Woche der Erkrankung der Typhusbacillus bei den modernen Untersuchungsmethoden im Blut in 100 Proz. drgl. beständig gefunden.

Im weiteren Verlaufe der Erkrankung verkleinert sich der Prozentsatz sehr.

Für den Choleravibrio gilt vielleicht vollkommen derselbe Umstand, nur ist er zeitlich anders verteilt.

Während einer Choleraepidemie kommt der Vibrio bekanntlich in eine viel größere Anzahl von Därmen, als sich typische Cholera-kranker erweisen. Sehr oft hat man bei Menschen, die keine krankhaften Störungen von seiten der Gedärme aufwiesen, Choleravibrionen (in den Faeces) gefunden.

In anderen äußerst zahlreichen Fällen rufen die Vibrionen eine örtliche Störung der Darmtätigkeit hervor, einen einfachen Cholera-durchfall, oder den vorhergehenden Choleradurchfall. Aus diesem Zustande gibt es bekanntlich zwei Uebergänge, entweder in Genesung, oder es folgt sodann der typische Cholerasympptomenkomplex. Im ersten Fall beschränkt sich, unserer Meinung nach, die Anwesenheit der Choleravibrionen auf den Darmkanal, im zweiten dringen sie durch das Blut oder durch die Lymphe in die inneren Organe ein und lokalisieren sich in bedeutender Anzahl im zentralen Nervensystem. Hier wird eine große Anzahl derselben gefunden, wie aus meinen Präparaten zu sehen ist. Nachdem sie durch das Blut oder die Lymphe durchgegangen sind, verändern sie dieselben so, daß ein weiteres Eindringen für sie unmöglich gemacht wird. Im zentralen Nervensystem fangen diese Vibrionen ihre Tätigkeit an, und nur dann tritt der typische Cholerasympptomenkomplex hervor, dessen Komplemente alle eine zentrale Herkunft haben. Somit erscheint es uns möglich, daß man vielleicht im Blut lebender Cholera-kranker einfach deswegen keine Choleravibrionen gefunden hat, weil man dieselben zu spät daselbst gesucht hat, oder dann, wenn sie dort noch nicht vorhanden sind.

Dadurch wird vielleicht auch der Unterschied erklärt, der scheinbar in dieser Beziehung zwischen dem Menschen und anderen Tieren, in deren Blut Vibrionen gefunden werden, vorhanden ist.

In dieser Richtung sind natürlich vor allem neue Tatsachen und folglich neue Untersuchungen notwendig, mit denen wir bereits begonnen haben.

Nachdruck verboten.

Morphologie und Biologie des Keuchhustenbacillus.

[Aus der Abteilung für allgemeine Pathologie des Kaiserl. Institutes für experimentelle Medizin (Vorsteher: Prof. Dr. W. W. Podwyssotsky).]

Von Dr. med. **W. N. Klimenko,**

Privatdozent an der Kaiserl. militärärztlichen Akademie (St. Petersburg) und Assistent an der Abteilung.

Mit 1 Tafel.

Die Morphologie und Biologie des von Bordet und Gengou (1) entdeckten Mikroorganismus des Keuchhustens ist nur beiläufig von ihnen in ihren Arbeiten berührt worden. Ebenso wenig Beachtung hat diese Frage gefunden seitens aller Forscher, die den Fund von Bordet und Gengou bestätigen, nämlich Sulima (2), C. Fraenkel (3), Arnheim (4) und Seiffert (5); wir finden bei ihnen darüber nur vereinzelte Bemerkungen.

Die Untersuchung der Morphologie und Biologie des Mikroorganismus erscheint indessen angesichts seiner für den Keuchhusten unzweifelhaften ätiologischen Bedeutung absolut notwendig.

Der Bordet-Gengousche Mikroorganismus ist ein kleines Stäbchen mit abgerundeten Enden. Dieser Bacillus ist unbeweglich und geißellos. Er ist $1\frac{1}{2}$ –2mal so groß wie der Influenzabacillus. Die einzelnen Exemplare der Keuchhustenbakterien sind verschieden lang; man stößt bald auf langgestreckte, bald auf kurze (kokkenähnliche) Formen. Die Bacillen liegen manchmal paarweise mit den Extremitäten verbunden; Ketten werden nur ausnahmsweise gebildet; man beobachtet manchmal solche beim Züchten in Milch. Der Keuchhustenbacillus ist in flüssigen Nährböden größer als auf festen Nährböden; er verkümmert beim Wachstum auf den letzteren. Wird er in einen flüssigen Nährboden übertragen, so wird er wieder größer.

Durch Tierpassage nehmen die Keuchhustenbacillen ebenfalls an Größe zu. Involutionsformen kommen nur selten vor. Relativ leicht kann man solche beim Züchten in Peptonwasser wahrnehmen.

Der Bacillus bildet weder Kapsel noch Sporen.

Der Keuchhustenbacillus wird nicht nach Gram gefärbt; er ist nicht säurefest. Die gewöhnlichen Anilinfarbstoffe (in alkoholwässrigen oder phenolhaltigen Lösungen, ebenso wie in mit Anilinwasser bereiteten Lösungen) färben diesen Bacillus leicht, und zwar schon in der Kälte. Um ein gut gefärbtes Präparat zu erhalten, genügt es, den Farbstoff auf dasselbe während weniger Sekunden einwirken zu lassen.

Der Keuchhustenbacillus wird nicht von allen Farbstoffen gleich stark gefärbt; so färben ihn Methylen- und Toluidinblau weniger intensiv als andere Farbstoffe.

Die letzterwähnte Besonderheit tritt grell hervor, sobald wir ein

Präparat, wo nebeneinander der Keuchhustenbacillus und Staphylokokken *Bac. subtilis* usw. liegen, anfertigen. Wir können dann einen ausgesprochenen Färbungsunterschied zwischen diesen Mikroben konstatieren, indem sich der Keuchhustenbacillus unvergleichlich schwächer als die anderen Mikroorganismen färbt. Die genannte Eigenschaft der blauen Farbstoffe hängt übrigens ebenfalls von ihrem Bereitungsmodus ab. So färbt Methylenblau in besagter Weise bloß, wenn es phenolhaltig ist. Bei Benutzung einer wässerigen Alkohol- oder der Löfflerschen Methylenblaulösung wird der Keuchhustenbacillus ebenso intensiv wie die übrigen Mikroorganismen gefärbt.

Die 5-proz. wässrige Phenol-Toluidinblaulösung gibt dem Keuchhustenbacillus eine Differentialfärbung; er nimmt eine Lilafarbe an, während alle anderen Mikroorganismen fast ausnahmslos blau gefärbt sind.

Der Influenzabacillus gehört zu den Ausnahmen: Auf einem mit dieser Lösung beschickten Präparate einer Reinkultur nehmen einige Exemplare eine Lilafarbe an, während die übrigen blau gefärbt sind; manchmal ist diese Lilafarbe selbst dem ganzen Präparate eigentümlich.

Nach Bordet und Gengou (6) soll bekanntlich der Keuchhustenbacillus bipolar sein. Diese Behauptung besteht zum Teil mit Recht, da die Bipolarität von vielen Bedingungen abhängt. Eine der wichtigsten ist die Färbungsmethode; eine ziemlich bedeutende Rolle spielt ebenfalls der Umstand, ob wir ein Präparat aus einer Reinkultur oder einem Ausstrich aus Sputum, Schleim aus der Luftröhre eines Hündchens, Exsudate aus der Bauchhöhle irgendeines Tieres usw. untersuchen.

Die Bipolarität des Keuchhustenbacillus ist gut ausgesprochen bei Benutzung folgender Farbstoffe: Karbilmethylenblau von Kühne und Karbittoluidinblau¹⁾, besonders des letzteren. Werden andere Farbstoffe oder selbst dieselben, aber auf andere Weise bereitet, benutzt, dann zeigt der Keuchhustenbacillus gar keine Bipolarität (der ganze Bakterienkörper ist gefärbt), oder man beobachtet auf einem Präparate nur sehr wenige bipolare Individuen.

Bei Anwendung von nach dem Kühneschen Verfahren bereitetem Methylenblau kommen manchmal Mißerfolge vor, besonders wenn Präparate aus einer Kultur gefärbt werden.

Dagegen gelang es mir, bei Anwendung von nach dem in dem in der Anmerkung beschriebenen Verfahren bereitetem Toluidinblau immer (mit Ausnahme eines Falles, der weiter unten behandelt werden wird), die Bipolarität des Keuchhustenbacillus wahrzunehmen, ebensowohl bei Benutzung eines Präparates aus einer Reinkultur als auch eines Ausstriches aus Sputum eines Keuchhustenkranken usw. Die Bipolarität tritt zwar manchmal mehr, manchmal weniger deutlich hervor. Die charakteristischen Präparate erhielt ich aus dem Sputum von an Keuchhusten Erkrankten, aus dem Bauchhöhlenexsudate von bald nach Einverleibung einer Keuchhustenbacilluskultur in die Bauchhöhle gefallenem Tieren und aus dem Luftröhrenschleime von mit diesem Bacillus infizierten jungen Hündchen.

Die beste Färbemethode ist die folgende:

Das Präparat wird bereitet, an der Luft getrocknet und fixiert, gemäß den gewöhnlichen Vorschriften der bakteriologischen Methodik.

1) Karbittoluidinblau wird folgendermaßen bereitet: Toluidinblau (Grübler) 5,0. Alkohol absol. 100 ccm, Aqu. destill. 500 ccm. Der Farbstoff muß in der Kälte vollständig aufgelöst werden. Sobald das geschehen ist, fügt man 500 ccm 5-proz. wässrige Karbollösung hinzu. Die Mischung wird 1—2 Tage aufbewahrt und dann filtriert. Sie ist dann zur Benutzung geeignet.

Nachdem es ganz abgekühlt ist, gieße ich darauf Karbaltoluidinblau, lasse es 2—3 Sekunden einwirken, spüle sofort gründlich mit Wasser und trockne. Vorzügliche Präparate werden dank diesem einfachen Verfahren erhalten.

In den Ausstrichen aus Sputum an Keuchhusten Erkrankter gelang es mir in den letzten 50 Fällen, ungeachtet des späten Krankheitsstadiums, immer typische bipolare Bacillen aufzufinden. Es kostete allerdings einige Mühe, sie zu entdecken, und die bipolaren Bakterien fanden sich in nur beschränkter Zahl. Die Färbung des Sputums mit Karbaltoluidinblau wird es vielleicht ermöglichen, manchmal bakterioskopisch entweder die Diagnose Keuchhusten zu bestätigen oder sie selbst zu stellen.

Ich rekapituliere: Der soeben erwähnte Farbstoff färbt den Keuchhustenbacillus bipolar, weniger intensiv als die anderen Bakterien und dabei in einer ganz verschiedenen Farbe, nämlich lila und nicht blau, wie die übrigen Mikroorganismen.

Oben wurde schon erwähnt, daß es nur einmal nicht gelungen ist, die bipolare Färbung des Keuchhustenbacillus mit Karbaltoluidinblau zu erhalten, nämlich in Schnitten von Lungen und Luftröhren bei jungen Hündchen, die dem Keuchhusten erlegen waren. Das hängt wahrscheinlich von der Härtung dieser Organe in Formalin und Alkohol und ihrer Einbettung in Paraffin und vielleicht von dem Einflusse eines oder zweier der genannten Faktoren ab.

Es ist beachtenswert, daß die bipolare Färbung des Keuchhustenbacillus in dem frischen Lungensaft und dem unbearbeiteten Trachealschleime derselben jungen Hündchen gut gelungen ist.

Ich erachte es als nicht überflüssig, noch auf eine Besonderheit des von uns untersuchten Mikroorganismus aufmerksam zu machen, nämlich daß er durch Tierpassage empfänglicher für Toluidinblau wird.

Wie bei vielen anderen Bakterien, kann man manchmal beim Keuchhustenbacillus die Anwesenheit von Babes-Ernstschen Körnchen konstatieren. Ich habe sie nur in den Präparaten von Reinkulturen des Keuchhustenbacillus, gleichgültig auf welcher Art der Nährboden, wahrgenommen, aber niemals auf Ausstrichen von Sputum, Bauchhöhlenexsudaten usw.

Es kostet ziemlich viel Mühe, den Keuchhustenbacillus aus von dieser Krankheit Befallenen stammendem Material zu züchten.

Am besten gelang es in frischen Fällen, d. h. entweder während des katarrhalischen Stadiums oder während der ersten Woche des spasmodischen Stadiums des Keuchhustens. Die Möglichkeit, den Bacillus aus dem Sputum der Kranken während der späteren Wochen dieses Stadiums zu züchten, ist unbedingt noch vorhanden, aber ein positives Resultat wird nicht immer erzielt.

Die Erklärung dieses Umstandes ist darin zu suchen, daß das Sputum der Kranken während des katarrhalischen und der ersten Woche des spasmodischen Stadiums den spezifischen Krankheitserreger in großer Menge enthält. Je länger die Dauer der Krankheit, desto mehr ist die Zahl des Keuchhustenbacillus im Sputum verringert. Diese zuerst von Bordet und Gengou (7) beobachtete Erscheinung findet ihre Bestätigung ebensowohl in unseren Beobachtungen, wie in denen von Seiffert (8).

Um den Keuchhustenbacillus aus dem frischen Sputum zu züchten, ist eine ziemlich große Menge (2—3 ccm) desselben notwendig. Unter

„frischem“ Sputum verstehe ich das in den letzten 24 Stunden gesammelte. Weder erbrochene Massen noch antiseptische Stoffe dürfen ihm zugesetzt sein. Vor Anlegung der Kultur muß das Sputum 4—6mal sorgfältig mit steriler physiologischer Kochsalzlösung gespült werden. Ein Klümpchen des gewaschenen Sputums wird alsdann mit Hilfe eines Wattetampons oder einfach einer Platinöse auf der Oberfläche einer mit Blutagar beschickten Petri-Schale ausgestrichen oder selbst, dem Rate von Seiffert (9) folgend, in dasselbe eingerieben.

Um den Keuchhustenbacillus aus dem vom Menschen stammenden Material zu züchten, ist, wie zuerst Bordet und Gengou gezeigt haben, sehr blutreicher Agar notwendig. Diese Autoren gebrauchen dazu einen eigenen, von ihnen neu bereiteten Kartoffelglyzerinblutagar¹⁾. Bordet und Gengou (10) empfehlen, unbedingt defibriertes Menschen- oder Kaninchenblut zu benutzen. Unsere Erfahrungen beweisen, daß man dazu das Blut jedes beliebigen Tieres, wenn es nur steril entnommen ist, gebrauchen kann.

Wir gebrauchen fast immer, aus finanziellen Gründen, Hunde- und nur selten Kaninchenblut. Der mit dem Blute der letzten Tierart beschickte Blutnährboden ist röter, als der mit Hundeblut beschickte. Der Keuchhustenbacillus gedeiht ebensogut auf dem einen wie auf dem anderen Blutnährboden.

Wir benutzen den etwas von uns modifizierten Bordet-Gengouschen Blutnährboden, um den Keuchhustenbacillus aus dem Sputum zu züchten. Die Modifikation besteht darin, daß wir den Gehalt des Kartoffelglyzerinagars an Agar bis 4 Proz. erhöht und, wie es sich später als möglich herausgestellt hat, den Blutgehalt verringert haben. Wir vermengen 2 Teile Agar mit 1 Teil Blut. Der so erhaltene Nährboden ist fester als der Originalnährboden von Bordet und Gengou, was das bequemere Ausstreichen des Sputums zur Folge hat. C. Fraenkel (11) benutzt mit Erfolg statt des Kartoffelglyzerinagars gewöhnlichen 2½-proz. Agar, während Seiffert den Blutgehalt verringert; er setzt 1 Teil Blut zu 4 Teilen Bordet-Gengouschem Kartoffelglyzerinagar hinzu.

Das zur Bereitung der Nährböden nötige defibrinierte Blut kann höchstens 1½ Wochen in der Kälte aufbewahrt werden. Wir empfehlen dringend, nie außer acht zu lassen, jede neue Portion des Blutes oder jede neue Portion der Blutnährböden behufs ihrer Sterilität auszuprobieren. Die Nährböden sollen zu diesem Zwecke vor Beschickung 18—24 Stunden im Brutschranke bei 37—38° C belassen werden. Diese Vorsichtsmaßregel darf nie als entbehrlich betrachtet werden, denn sie schützt vor manchen unangenehmen Zufälligkeiten.

Um die Kulturen auf den Blutnährböden vor schnellem Austrocknen zu bewahren, kann man sie in hohe, mit Glasstöpsel versehene Zylinder eintragen, auf deren Boden mit Wasser oder noch besser mit wässriger Sublimatlösung (1:2000) durchtränkte Watte sich befindet. Die Kulturen

1) Der Bordet-Gengousche Kartoffelglyzerinblutagar wird folgendermaßen bereitet: Zu 200 ccm 4-proz. Glycerinwasser werden 100,0 in Scheiben zerschnittene Kartoffeln hinzugefügt. ¼ Stunde im Autoklaven bei + 115° C belassen und durch Leinwand oder Glaswatte filtriert. 50 ccm Kartoffelglyzerindekott mit 150 ccm 0,6-proz. Kochsalzlösung und 5,0 Agar versetzen. (Der Agar wird im Autoklaven bei + 115° gelöst.) Der so bereitete Nährboden wird nachher à 2—3 ccm in Probiergläser verteilt und sterilisiert. Das den Tieren steril entnommene Blut wird defibriniert und in gleicher Menge dem soeben beschriebenen verflüssigten und auf 60° C erkälteten Agar zugesetzt. Sorgfältig das Blut mit dem Agar durcheinandermischen!

erhalten sich in einer solchen feuchten Kammer längere Zeit, dafür wächst allerdings Schimmel sehr oft durch den Stöpsel hindurch.

Das Anbrennen, sowohl des inneren wie des äußeren Endes des Stöpsels, beugt noch nicht dem Durchwachsen der Schimmelpilze vor. Guttaperchakappen sind vielleicht in dieser Hinsicht vorzuziehen, aber sie sind weniger bequem als feuchte Kammern, sobald man Kulturen in großer Anzahl unterhalten will.

Die aus dem Sputum der Kranken gezüchteten Keuchhustenbacillenkolonien werden gewöhnlich makroskopisch erst am 2. Tage sichtbar. Manchmal sind die Kolonien so klein, daß man zur Hilfe einer Lupe Zuflucht nehmen muß.

Was ihr Aussehen betrifft, so stellen die Kolonien scharf konvexe, runde, glänzende Wölbungen dar. In manchen Fällen kann man Kolonien von etwas gauer Farbe bemerken.

Beläßt man eine beschickte Petri-Schale nach 2-tägigem Aufenthalte im warmen Brutschranke auf weitere 2 Tage im warmen Brutschranke, nachdem man sie in eine feuchte Kammer eingebracht hatte, so können die Kolonien manchmal die Größe eines Mohnkornes erreichen. Sind die Keuchhustenbacillenkolonien zahlreich, so kann man manchmal einen sie umringenden hämolysierten Hof (Hämolys des Blutnährbodens) beobachten.

Sobald der Keuchhustenbacillus sich gut den künstlichen Existenzbedingungen angepaßt hat, werden die Kolonien auf dem Blutnährboden schon am 2. Züchtungstage sichtbar und die Größe eines Mohnkornes wird von ihnen ebenfalls nach 2-tägigem Aufenthalte im Brutschranke erreicht.

Die hämolytischen Eigenschaften der Bakterie steigen ebenfalls bis zu einem gewissen Grade, aber je mehr Zeit seit der Züchtung des Keuchhustenbacillus aus dem Sputum der Kranken verflossen ist, desto abgeschwächer erscheint dieses hämolytische Vermögen.

Bei intensiver Hämolys des Nährbodens gelingt es manchmal, die Bordet-Gengouschen Mikroorganismuskolonien direkt mikroskopischer Untersuchung zu unterwerfen; sie erscheinen dann als farblose, runde, stark lichtbrechende Gebilde.

Durch irgendbeliebige Tierpassage (z. B. durch Meerschweinchen, Kaninchen, Affen, junge Hündchen usw.) wird die Entwicklungs- und Hämolysierfähigkeit des Keuchhustenbacillus auf Blutnährboden stark gesteigert.

Das Aussehen der Kolonien bleibt unverändert, manchmal werden sie zwar flacher, ihre Größe aber ist dabei erhöht. Bei leichter Züchtung erreichen sie schon am 2. Tage Mohnkorngröße und nach 3—4 Tagen einen Durchmesser von 2 und $2\frac{1}{2}$ mm, in Ausnahmefällen selbst von 3 mm. Eine ziemlich interessante Beobachtung soll hier gleich Erwähnung finden: Obgleich sehr langsam, setzen doch die Kolonien ihr Wachstum selbst bei 18—20° C fort. Was die hämolytische Eigenschaft des Keuchhustenbacillus anbelangt, so wird sie durch Tierpassage stark gesteigert.

Infolge des Durchsichtigwerdens des Blutnährbodens erscheinen die Kolonien bei durchgehendem Lichte absolut durchsichtig; bei mikroskopischer Untersuchung erscheinen die als strukturlose, durchsichtige Kreischen.

Um Wiederholungen zu vermeiden, soll hier gleich bemerkt werden, daß ausnahmslos alle Keuchhustenbacilluskulturen nach jeder beliebigen

Tierpassage schneller und intensiver als die Grundkolonien sich auf den Nährböden entwickeln.

Wie schon in einer unserer Arbeiten (15) erwähnt, begannen unsere Keuchhustenkulturen einige Monate nachdem sie aus dem Sputum von Kranken gezüchtet waren, auf allen gewöhnlichen Laboratoriumsnährböden zu gedeihen. Die Nachprüfung von Bordet (12) hat ihm ein positives Resultat mit seinem Keuchhustenbacillus geliefert. In seiner Arbeit über den Keuchhusten weist dagegen C. Fraenkel (13) darauf hin, daß die von ihm gezüchteten Keuchhustenbacillen, selbst nach 8-monatlichem Wachstum bei Laboratoriumsbedingungen, exklusiv auf Blutnährböden gedeihen.

Diese notwendigen Bemerkungen vorausgeschickt, wenden wir uns wieder der Beschreibung des Keuchhustenbacilluswachstums auf verschiedenen Nährböden zu.

Auf Agarplatten werden die Keuchhustenbacillenkolonien makroskopisch nach 24—48 Stunden sichtbar. Werden sie aber mikroskopisch bei schwacher Vergrößerung untersucht, so kann man sie schon nach 16—24 Stunden sehen. Weder die oberflächlichen noch die tiefen Kolonien bieten ein charakteristisches mikroskopisches Bild dar. Die durch Passagekulturen gewonnenen Kolonien sind etwas größer und plumper als die Grundkolonien. Die in der Tiefe liegenden Kolonien sind entweder rund oder von verkürzter zigarrenähnlicher Form, während die an der Oberfläche sich befindenden Kolonien stets rund sind.

Die Farbe der tiefen Kolonien ist im Anfange sehr hellbraun, aber je länger, desto intensiver wird der braune Farbenton. Kurz nach ihrem Erscheinen besitzen die Kolonien keine innere Struktur, aber bald nachher tritt in ihnen eine sehr zarte Punktiertheit ein, die allmählich plumper wird, hervor. Bei durchgehendem Lichte betrachtet, sehen die tiefen Kolonien makroskopisch wie weiße Punkte aus. Unter denselben Bedingungen untersucht, sind die oberflächlichen Kolonien kurze Zeit nach ihrem Erscheinen durchsichtig, aber selbst dann fällt manchmal eine leichte Opaleszenz auf. Ihre Intensität nimmt so schnell zu, daß schon 18—24 Stunden nach ihrem Erscheinen die auf der Agaroberfläche sich befindenden Kolonien ganz undurchsichtig geworden sind. Ihre zentrale Partie nimmt Milchfarbe mit gelbem Farbenton an. Bei durchfallendem Lichte erscheinen die jungen oberflächlichen Kolonien als glänzende sehr schwach opaleszierende Halbkugeln.

Infolge des Wachstums verflachen die Kolonien mehr und mehr, und parallel damit nimmt ihre zentrale Partie eine fast weiße Farbe mit einem Strich ins Gelbe an, während die Opaleszenz an der Peripherie intensiver wird. Der Durchmesser der jungen Kolonie beträgt 0,5 bis 1 mm und der der alten 3—4-tägigen Kolonien erreicht 2—4 mm.

Die Grundkulturen gedeihen nicht immer auf Gelatineplatten, während die durch Passage gewonnenen ausnahmslos gedeihen. Was von den Agarkolonien erwähnt ist, besteht zu Recht ebenfalls für die Gelatinekolonien. Uebrigens sind die letzteren überhaupt kleiner, die Punktiertheit ist zarter, der Stich ins Braune und die Opaleszenz sind weniger intensiv als bei den Agarkolonien.

Auf schrägem Kartoffelglyzerinblutagar, bald nach Züchtung aus dem menschlichen Organismus, wächst der Keuchhustenbazillus, wie schon von Bordet und Gengou erwähnt worden ist, sehr kümmerlich. Das Wachstum wird gewöhnlich erst am 2. Tage bemerkbar. Die 2-tägige Kultur auf Blutnährböden (Kaninchenblut) zeigt folgendes Aus-

sehen: Stark über die Oberfläche des Nährbodens hervorragender, glänzend weißer Belag, auf mit Hundebhut beschicktem Nährboden nimmt der Belag eine grau-weißliche Farbe an. Da der Keuchhustenbacillus hämolytische Eigenschaft besitzt, so erscheint, beim Lichte untersucht, die Partie des Nährbodens, wo sich der Bacillus entwickelt, durchsichtig; selbstverständlich tritt das am deutlichsten da auf, wo der Nährboden eine dünne Schicht bildet. Je größer die Wuchsanpassung des Keuchhustenbacillus an den Blutnährboden, desto üppiger und schneller entwickelt er sich darauf.

Wenn wir bei Bereitung des Blutnährbodens den Kartoffelglyzerinagar durch einfachen oder 1—3-proz. Glycerinagar ersetzen, so übt dieser Ersatz keinen schädlichen Einfluß auf die Entwicklung des Keuchhustenbacillus aus. Das Aussehen der Kultur bleibt unverändert.

Auf schrägem 1-proz. Glycerinascites oder Serumagar¹⁾ wächst der Keuchhustenbacillus als glänzender, opaleszierender Belag von etwas grauer Farbe; er trübt das Kondensationswasser. Der Belag nimmt nach 4—5 Tagen einen weißen Farbenton an und ragt deutlich über die Oberfläche des Nährbodens hervor.

Ganz ebenso entwickelt sich der Keuchhustenbacillus auf schrägem gewöhnlichen Agar und 1—5-proz. Glycerin- und 1—2-proz. traubenzuckerhaltigem Agar.

Die Grundkulturen produzieren auf den letztgenannten Agarnährböden große Mengen von Schleim, während die durch Passage erhaltenen nur wenig produzieren.

Auf geradem, gewöhnlichem, 1—5-proz. Glycerin-, 1—2-proz. traubenzuckerhaltigem Agar, ebenso wie auf Glycerinascites- und Glycerinserumagar entwickelt sich der Keuchhustenbacillus als ein weißlicher, längs der ganzen Stichstelle sich hinziehender Faden, ringsum die Stichstelle bildet sich auf der Agaroberfläche ein etwas die Nährbodenoberfläche überragendes, glänzendes Häutchen, im Anfang von etwas grauer und nach 4 bis 5 Tagen von weißlicher Farbe. Dieses Häutchen erstreckt sich nie bis an die Ränder des Nährbodens. Der Keuchhustenbacillus ruft keine Gasbildung auf Traubenzucker- und Glycerinagar hervor.

Auf gerader Gelatine findet das Wachstum des Keuchhustenbacillus längs der ganzen Stichstelle in Form eines weißlichen Fadens statt; ringsum die Stichstelle entsteht auf der Nährbodenoberfläche ein opaleszierendes, chagrinartiges Häutchen von etwas grauer Farbe, mit schwachem Glanze. Das Wachstum der Gelatinestichkulturen steht stark hinter dem der Agarstichkulturen nach. Die Gelatine wird nie vom Keuchhustenbacillus verflüssigt. Das Wachstum auf schräger Gelatine ist charakteristisch. Es entsteht ein etwas grauer, leicht opaleszierender, chagrinartiger Belag mit schwachem Glanze, der deutlich, manchmal scharf die Nährbodenoberfläche überragt. Die Kulturen sind beim durchgehenden Lichte undurchsichtig, opaleszierend. Das Wachstum des Belages ist in den ersten 3—4 Tagen nur auf die Saatzfurche beschränkt, und die Ränder desselben sind dabei glatt. Bei 7—10-tägigen Kulturen ist der Belag unbedeutend in die Breite gezogen, und die Ränder werden kerbig. Die Grundkolonien entwickeln sich auf Gelatine sehr langsam, während die durch Passage erhaltenen relativ schnell auf ihr wachsen.

1) Man bereitet diese Agare, indem man in gleichen Teilen 1-proz. glycerin- und 3-proz. oder 4-proz. agarhaltigen Agars mit Ascitesflüssigkeit (Mensch) oder Blutserum (irgendwelches Tier) zusammenmengt.

Der Keuchhustenbacillus bildet auf Kartoffel einen glänzenden, schmierigen, feuchten Belag von etwas brauner Farbe. Das Wasser ist in den Kartoffelprobierröhrchen trüb und Schleim tritt in ihm auf.

Das gute Wachstum der Grundkulturen des Keuchhustenbacillus in flüssigen Nährböden findet nur dann statt, wenn die Höhe der Schicht nicht 1 cm übersteigt; die durch Passage erhaltenen Kulturen sind an diese Bedingung nicht gebunden, denn sie sind nicht so obligatorisch aerobisch wie die ersteren.

Der Keuchhustenbacillus wächst sofort nach Züchtung aus dem menschlichen Organismus auf 1-proz. glyzerinhaltiger Ascites-, Serum- und Blutbouillon¹⁾ und im Lackblute²⁾. Das Wachstum des Bacillus ist auf diesen Nährböden kein charakteristisches: Der Mikroorganismus wächst anfangs als Belag auf dem Glase an der Oberfläche der Flüssigkeit und nachher auf dem Boden des Gefäßes. Nach 1—2—3 Tagen entsteht in den 1., 2. und 4. Nährböden eine Trübung, und der letztere wird außerdem dunkler und braun. Die Blutbouillon wird ebenfalls nach dieser Frist dunkler und braun.

Der an das Wachstum auf einfachem Agar gewöhnte Keuchhustenbacillus gedeiht auf verschiedenartigen flüssigen Nährböden, von denen wir die folgenden untersucht haben:

1) Gewöhnliche Bouillon. Der Bacillus ruft Trübung und Schleimbildung hervor. Die Grundkulturen haben eine weniger intensive Trübung zur Folge als die durch Passage erhaltenen, aber sie verursachen eine viel beträchtlichere Schleimbildung.

2) 1-proz. Peptonwasser. Das Wachstum ist nicht so üppig wie auf gewöhnlicher Peptonbouillon und es findet keine Schleimbildung statt.

3) Milch. In den ersten 1—3 Tagen des Keuchhustenbacillenwachstums bleibt das Aussehen der Milch unverändert, aber nach dieser Frist beginnt eine allmähliche, immer fortschreitende Klärung derselben. Sobald die Milch ganz durchsichtig geworden ist, erblickt man einen unbedeutenden Bodensatz im Probierröhrchen. Die modifizierte Milch ist gelblich oder selbst gelb und gelbbraun, wenn sie bei zu hoher Temperatur sterilisiert worden ist. Die Reaktion der Milch wird nach und nach alkalischer (auf Lackmus). Die Grundkulturen rufen diese Milchveränderungen viel langsamer und schwächer als die durch Passage gewonnenen hervor. Während die letzteren den beschriebenen Prozeß im Verlaufe von 25—30 Tagen zustande bringen, vollzieht er sich bei den ersteren nach mindestens 60—70 Tagen. Wir erachten es als angebracht, nochmals darauf hinzuweisen, daß die Grundkulturen nie so intensive Milchveränderungen hervorrufen, wie die durch Passage erhaltenen.

In der bakteriologischen Literatur ist schon wiederholentlich die Fähigkeit, in der Milch die soeben beschriebenen Veränderungen zu verursachen, für verschiedenartige Bakterien vindiziert worden, so z. B. *Bac. paratyphosus* B, *Bac. enteritidis* Gärtner, die Gruppe *Bac. faecalis alcaligenes* und ihnen verwandte Mikroorganismen. Die Klärung der Milch wird, wie bekannt, von einigen Autoren der

1) Diese Nährböden bestehen aus gleichen Teilen 1-proz. glyzerinhaltiger Peptonbouillon und einer der folgenden Flüssigkeiten: Ascites, Blutserum oder defibriniertes Blut jedes beliebigen Tieres.

2) Lackblut wird folgendermaßen bereitet: 1 Teil Blut + 9 Teile sterilen destillierten Wasser.

Bildung eines das MilCHFett lösenden Alkalis zugeschrieben. Diese Frage hat übrigens, wie aus der chemischen Literatur ersichtlich ist, bis jetzt die Aufmerksamkeit der Forscher wenig auf sich gelenkt und harrt noch der Lösung.

4) Petruschkys Nährboden, 1 Proz. Peptonwasser mit 1—2 Proz. Milch- oder Traubenzucker), Barsiekowscher Nährboden mit einer von den genannten Zuckerarten. Der Keuchhustenbacillus wächst kümmerlich, die Nährböden werden getrübt; die neutrale Reaktion aller dieser Nährböden wird in die alkalische umgewandelt. Man sieht also, daß der Bacillus die untersuchten Kohlenhydrate und Kohlenwasserstoffe nicht abbaut. Ebenso unwirksam hat er sich auf Ameisensaurem Natrium gezeigt.

5) W. L. Omelianskis Nährboden (Peptonbouillon mit 0,5 Proz. Ameisensauren Natriums). Es entsteht eine Trübung; keine Gasbildung.

Eigelnährboden von M. M. Nastjukow (14) und Neutralrotagar von Rothberger (nach dem Verfahren von Oldenkopp bereitet). Auf dem ersten Nährboden fand das Wachstum des Keuchhustenbacillus bald nach Züchtung aus dem menschlichen Organismus, d. h. als er noch der Fähigkeit bar war, auf gewöhnlichen Laboratoriumsnährböden zu gedeihen, statt, auf dem zweiten Nährboden erst, nachdem er diese Fähigkeit schon erworben hatte.

Das nicht sehr üppige Wachstum des Keuchhustenbacillus auf dem Nastjukowschen Nährboden erscheint in der Form eines weißlichen, glänzenden Belages. Nur mit Mühe kommt man dazu, das Wachstum des Bacillus auf diesem Nährboden aufrecht zu erhalten; fast tägliche Ueberimpfungen sind erforderlich, und selbst dann sistiert bald das Wachstum der Kulturen auf diesem Nährboden.

Auf dem zweiten von den genannten Nährböden entwickelt sich der Keuchhustenbacillus hauptsächlich in den oberen Schichten. Der Nährboden nimmt eine tief kirschrote, selbst fast schwarze Farbe mit einem Stich ins Kirschrote an.

Wir haben mehrmals und in den verschiedensten Fristen die Probe auf die Indolreaktion der Keuchhustenbacilluspepton- und -Bouillonkulturen gestellt. Die Indolbestimmung wurde sowohl nach dem gewöhnlichen, von Maassen modifizierten, wie nach dem von Ehrlich vorgeschlagenen Verfahren vorgenommen. Beide Methoden haben immer ein negatives Resultat geliefert. Wir können folglich mit Sicherheit behaupten, daß der Keuchhustenbacillus keine Indolbildung hervorruft.

Der Keuchhustenbacillus ist ein Aërobe, aber kein obligatorischer. Das Wachstumstemperaturoptimum ist bei 36—38° C.

Wir haben einige vorläufige Experimente, um den Einfluß der Reaktion des Nährbodens auf das Wachstum des Keuchhustenbacillus klarzulegen, unternommen. Er gedeiht am besten auf neutralen und schwach alkalischen Nährböden. Er wächst weder auf stark alkalischen noch auf sauren Nährböden. Die Reaktionsbestimmung der Nährböden wurde stets auf Lackmus ausgeführt.

An das Ende der Schilderung des Keuchhustenbacilluswachstums auf verschiedenen Nährböden angelangt, erachten wir es als nicht überflüssig, eine allgemeine Charakteristik der Entwicklung des Bacillus auf diesen Nährböden zu geben. Die Tendenz, in die Dicke und nicht in die Breite zu wachsen, ist eine Eigenschaft, die sowohl den Grundkulturen wie den durch Passage gewonnenen Kulturen eigen ist. Eine weitere

bemerkenswerte Eigenschaft ist langsames Wachsen der Kulturen, besonders der Grundkulturen, auf allen untersuchten Nährböden. Das Wachstum war anfangs erst am 2. Tage bemerklich. Je mehr aber der Keuchhustenbacillus den künstlichen Existenzbedingungen angepaßt war, desto schneller entwickelte er sich, aber dessenungeachtet darf er doch nicht den schnell gedeihenden Bakterien zugezählt werden.

Die Pathogenität des Keuchhustenbacillus erstreckt sich nicht nur auf den Menschen, sondern auch auf eine ganze Reihe von Tieren. Er verursacht nach unseren Experimenten Keuchhusten bei jungen Hündchen (15), jungen Kätzchen (16) und Affen (15). Was die letzteren anbelangt, so sind unsere Beobachtungen schon von C. Fraenkel (3) bestätigt.

Die Einverleibung des Keuchhustenbacillus in das Blutssystem, die Bauchhöhle oder die Unterhaut hat bei verschiedenen Tieren mehr oder weniger schnellen Tod oder kurzdauernde Gesundheitsstörungen, von denen die Tiere sich schnell erholen, zur Folge.

Alle bis jetzt unternommenen Untersuchungen haben ergeben, daß alle von uns geprüften Tiere, und zwar in verschiedenem Grade, für den Keuchhustenbacillus empfänglich sind. Die stärkste Reaktion ist bei weißen Mäusen, Meerschweinchen, grauen Mäusen, jungen Hündchen, jungen Kätzchen und Tauben beobachtet worden; schwächer reagieren Kaninchen, erwachsene Hunde, erwachsene Katzen, Ziegen und Pferde. Viele andere Tiere werden wahrscheinlich in diese Liste eingetragen werden müssen.

Das wirksamste Verfahren, bei einem der genannten Tiere eine tödliche Erkrankung hervorzurufen, besteht darin, daß man in die Bauchhöhle eine ihm adäquate Menge Keuchhustenbacilluskulturen einverleibt. Die erwähnten Tiere überstehen relativ leicht intravenöse Injektionen dieser Bakterien. Die Einspritzungen in die Unterhaut werden von ihnen noch leichter vertragen.

Die Wirkung des Keuchhustenbacillus auf den Tierorganismus wird ausführlich in einer besonderen Arbeit auseinandergesetzt werden, hier begnügen wir uns mit diesen kurzen Bemerkungen.

Wir lassen ebenfalls die Frage unerörtert, ob der Keuchhustenbacillus ein Endo- oder Exotoxin produziert. Vieles spricht zugunsten der Meinung von Bordet und Gengou (17), daß er zu den endotoxischen Bakterien gehöre.

Es erübrigt noch, mit einigen Worten des Verhältnisses des Keuchhustenbacillus zum agglutinierenden Serum zu gedenken. Die von uns bereiteten agglutinierenden Kaninchen- und Hundesera waren wenig wirksam; das erstere aus dem Grunde, weil Kaninchen die Immunisation schlecht überstehen, und das zweite möglicherweise auch infolge des Immunisationsverfahrens. Im letzteren Falle wurde die Immunisation des Hundes nicht speziell behufs Erlangung eines agglutinierenden Serums vorgenommen. Der Titer des Kaninchenserums war 1:100 und derjenige des Hundeserums 1:600. Bis zu diesen Grenzwerten werden von ihnen meine Grundkulturen und durch Passage gewonnenen Kulturen, gleichviel ob die Keuchhustenbacilluskulturen auf Blut- oder gewöhnlichem Agar gezüchtet waren, agglutiniert. Mit Grundkulturen bekamen wir manchmal das Phänomen der Pseudoagglutination. Meine Sera agglutinierten ausschließlich den Keuchhustenbacillus und keine anderen Bakterien.

Von großem praktischen Interesse ist die Frage, wie lange der Keuchhustenbacillus lebensfähig auf verschiedenen Nährböden bleibt.



Dr. Klimenko ad nat. prot.

Viel. von Gustav Fischer in Ver.

Dr. Klimenko

Die Lebensfähigkeit hält ohne Ueberimpfung 1 Monat auf Blutnährboden, 10–14 Tage (manchmal auch länger) auf Gelatine und 3–4 Wochen auf Agar an. Die Lebensdauer in Bouillon ist 30 und in seltenen Fällen 45 Tage.

Wir schließen hiermit unsere Arbeit in der Hoffnung, bald weitere Mitteilungen über den Keuchhustenerreger machen zu können.

Literatur.

- 1) Bordet et Gengou, Ann. de l'Inst. Pasteur. T. XX et XXI.
- 2) Soulima, A. et H., Compt. rend. soc. de biol. T. XLIII. 1907. p. 11 et 370.
- 3) Fraenkel, C., Münch. med. Wochenschr. 1908.
- 4) Arnheim, Berl. klin. Wochenschr. 1908.
- 5) Seiffert, Münch. med. Wochenschr. 1909.
- 6) Bordet et Gengou, Ann. de l'Inst. Pasteur. T. XX.
- 7) —, ibid.
- 8) Seiffert, loc. cit.
- 9) —, ibid.
- 10) Bordet et Gengou, Ann. de l'Inst. Pasteur. T. XX.
- 11) Fraenkel, C., loc. cit.
- 12) Bordet, Bull. de l'Acad. de méd. de Belgique. Sér. IV. T. XXII. p. 729.
- 13) Fraenkel, C., loc. cit.
- 14) Nastjukow, M. M., Wratsch. 1893. No. 33 u. 34. [Russisch.]
- 15) Klimenko, W. N., Russkij Wratsch. 1908. p. 637. [Russisch.] — Centralbl. f. Bakt. etc. Abt. I. Orig. Bd. XLVIII. 1908.
- 16) —, Dtsche med. Wochenschr. 1908. No. 47.
- 17) Bordet, loc. cit.

Erklärung der Abbildungen.

- Fig. 1. Reinkultur des Keuchhustenbacillus aus Bordet-Gengouschem Blutagar, Karboltoluidinblaufärbung.
- Fig. 2. Dieselbe Kultur aus gewöhnlichem Agar. Dieselbe Färbung.
- Fig. 3. Dieselbe Kultur aus Bouillon. Dieselbe Färbung.
- Fig. 4. Dieselbe Kultur aus Milch. Dieselbe Färbung.
- Fig. 5. Dieselbe Kultur aus Peptonwasser. Einige Involutionsformen. Dieselbe Färbung.
- Fig. 6. Ausstrich aus dem Bauchhöhlenexsudate einer weißen Maus. Dieselbe Färbung.
- Fig. 7. Ausstrich aus dem Sputum eines an Keuchhusten erkrankten Kindes. Ende der 1. Woche des spasmodischen Stadiums. Dieselbe Färbung.
- Fig. 8. Ausstrich aus dem Trachealschleime eines von Keuchhusten befallenen jungen Hundes. Dieselbe Färbung.
- Fig. 9. Dasselbe. Färbung mit 10-fach mit Wasser verdünnter Ziehl-Neelsen-scher Karbolfuchsinlösung.
- Alle Präparate sind bei Vergrößerung Okul. 4, Obj.-Immers. $\frac{1}{12}$ Reichert abgebildet.

Nachdruck verboten.

Ratinbacillus und Bacillus enteritidis Gärtner.

[Aus der hygienischen Untersuchungsanstalt der Stadt Danzig.]

Von Kreisassistentenarzt Dr. Fritz Lebram.

Ratin ist ein Präparat, das zur Vertilgung von Ratten in den Handel gebracht wird. Es besteht nach der Aufschrift auf den uns zugänglichen, mit „Ratin II“ bezeichneten Büchsen aus einer „Bakterienkultur, die auf einem speziellen Nährboden gezüchtet wird“.

In Bd. XXVIII der „Arbeiten aus dem Kaiserlichen Gesundheitsamte hat nun Xylander eine Reihe von Untersuchungen veröffentlicht,

deren Ergebnisse auf eine große Uebereinstimmung des „Ratinbacillus“ mit dem *Bacillus enteritidis* Gärtner hindeuten.

Zur weiteren Feststellung, ob der Ratinbacillus mit dem Gärtner'schen *Bacillus* identisch oder nahe verwandt ist, wurde uns am 29. September 1908 vom Bakteriologischen Institut der Landwirtschaftskammer für die Provinz Westpreußen eine Büchse Ratin II übersandt. Die Versuche wurden am 1. Oktober angesetzt.

Sowohl an einer weißen Maus als auch an einer weißen Ratte und an einem Meerschweinchen fanden Verfütterungsversuche statt. Das Meerschweinchen blieb am Leben; die Maus starb am 3. Oktober, die Ratte am 20. Oktober, beide jedoch nicht infolge des Ratingiftes.

Weitere Fütterungsversuche wurden nicht angestellt, da es uns nicht darauf ankam, die Wirksamkeit des Ratin II an Tieren zu erproben. Wir wollten vielmehr einen Vergleich zwischen dem Ratinbacillus und dem *Bacillus enteritidis* Gärtner anstellen. Zu diesem Zwecke mußten wir den Ratinbacillus zunächst reinzüchten.

Es wurden daher mit Material aus der Ratinbüchse verschiedene Nährböden beschickt, und zwar Agarröhrchen, Lackmusagarplatten und Bouillonröhrchen. Die Lackmusplatten und die Bouillonröhrchen blieben steril, dagegen zeigten sich auf dem Agar am 3. Oktober, also nach 2 Tagen, Kolonien, die in Reinkultur aus nach Gram nicht färbbaren, beweglichen Stäbchen bestanden. Kolonien irgend einer anderen Bakterienart traten in der ganzen Folgezeit nicht auf. Man mußte also annehmen, daß die auf dem Agar gewachsenen Stäbchen dem Ratinbacillus entsprachen.

Mit diesem Ratinbacillus wurde eine weiße Maus am 27. Oktober 1908 geimpft. Sie erhielt eine Oese einer 24 Stunden alten Agarkultur subkutan an der Schwanzwurzel und starb am 31. Oktober. Aus dem Blute wurde der Ratinbacillus in Reinkultur gezüchtet.

Weiterhin fanden zwischen dem Ratinbacillus und dem *Bacillus enteritidis* Gärtner vergleichende Untersuchungen statt, die zu folgenden Resultaten führten:

Auf Lackmusagarplatten bilden beide kleine, blaue Kolonien.

Traubenzuckerbouillon wird von beiden vergärt.

Lackmusmolke wird zunächst von beiden gerötet, allerdings vom *Bacillus enteritidis* etwas stärker. Während dann weiter der Gärtner'sche *Bacillus* schon nach 5—6 Tagen einen Umschlag der roten Färbung in eine blaue herbeiführt, die von Tag zu Tag intensiver wird, bleibt die mit dem Ratinbacillus beschickte Lackmusmolke noch lange Zeit gerötet. Die mit dem *Bacillus enteritidis* geimpfte Lackmusmolke wird schließlich ganz tiefblau. Das Ratinröhrchen dagegen zeigt noch lange Zeit, etwa 2—3 Wochen, eine rötliche Färbung, wenngleich es auch allmählich etwas dunkler wird.

Neutralrotagar wird von beiden vergärt; bei beiden tritt Fluoreszenz ein.

Im Gelatinestich zeigen beide Bacillen keinerlei Verflüssigung; bei beiden bildet sich ein weißer, feuchter Knopf an der Oberfläche.

In Traubenzuckeragar stellt sich bei dem Ratinbacillus sowohl wie bei dem *Bacillus enteritidis* Gasbildung ein.

Bouillon wird zunächst von beiden gleichmäßig getrübt; während beim Gärtner-Bacillus aber schon nach 2—3 Tagen durch Bildung eines Bodensatzes allmählich Klärung eintritt, bildet sich beim Ratinbacillus ein Häutchen, das sich sehr viel langsamer niederschlägt, so daß

die Klärung erst erfolgt, nachdem das Röhrchen etwa 7—8 Tage im Brutschrank bei 37° gestanden hat.

Milch gerinnt bei beiden nicht; bei beiden wird sie allmählich gelblich und schließlich nach etwa 2—3 Wochen durchsichtig.

In Löfflerscher Malachitgrünlösung¹⁾ sind keine Unterschiede zwischen den beiden Bacillen wahrzunehmen. Bei dem Ratinbacillus sowohl wie bei dem Bacillus enteritidis Gärtner bleibt die Lösung zunächst unverändert. Nach einigen Tagen tritt eine schmutzig graugelbliche Verfärbung bei beiden ein, die mit der Zeit immer ausgesprochenener wird.

Wir sehen also, daß eine außerordentlich weitgehende Uebereinstimmung in dem Verhalten des Ratinbacillus und des Bacillus enteritidis Gärtner den verschiedensten Nährböden gegenüber besteht.

Zur weiteren Prüfung wurden aber noch Agglutinationsversuche angestellt. Zunächst wurde ein Gärtner-Serum verwandt, das durch intravenöse Behandlung eines Kaninchens mit einer durch Chloroform abgetöteten Kultur des Gärtnerschen Bacillus gewonnen war. Mit diesem Serum wurde eine Agglutination des Ratinbacillus noch in einer Verdünnung von 1:5000 erzielt. Das Nähere geht aus Tabelle I hervor.

Tabelle I.
Agglutination mit Gärtner-Serum.

Bacillus	Verdünnung des Serums von							Bemerkungen
	1:100	1:500	1:1000	1:2000	1:5000	1:7000	1:10000	
1) Gärtner	+++	++	+	0				Behandlungsstamm
2) Ratin	+++	+++	++	++	+	0		
3) Paratyphus B	+	0						
4) Paratyphus B Sandgrube	Spur	0						Aus dem Stuhl eines Patienten gezüchtet

Ein zweites Kaninchen wurde mit einer ebenfalls durch Chloroform abgetöteten Kultur des Ratinbacillus intravenös behandelt. Es gelang ein ziemlich hochwertiges Serum zu erhalten. Das Serum beeinflusste den Gärtner-Stamm bis zur Verdünnung von 1:2000. Der Behandlungstamm wurde in der Verdünnung von 1:5000 nur noch spurweise agglutiniert (siehe Tabelle II).

Tabelle II.
Agglutination mit Ratin-Serum.

Bacillus	Verdünnung des Serums von							Bemerkungen
	1:100	1:500	1:1000	1:2000	1:5000	1:7000	1:10000	
1) Gärtner	+++	+++	++	+	0			Behandlungsstamm
2) Ratin	+++	+++	++	++	Spur	0		
3) Paratyphus B	0							
4) Paratyphus B Sandgrube	++	0						

1) Deutsche med. Wochenschr. 1906. p. 295. Es wurde Grünlösung 2 verwandt.

Also auch durch die Agglutinationsversuche ist eine außerordentlich große Aehnlichkeit des Ratinbacillus mit dem Bacillus enteritidis Gärtner dargetan. Der Ratinbacillus ist dem Bacillus enteritidis Gärtner zum mindesten sehr nahe verwandt, so daß mit Rücksicht auf die hohe Toxizität des Gärtnerschen Bacillus bei der Verwendung des Ratin II gewisse Vorsicht wohl geboten scheint.

Nachdruck verboten.

Recherches expérimentales sur la rage des rats.

[Institut d'hygiène expérimentale et de parasitologie de l'Université de Lausanne.]

III^{ème} Mémoire.

Par Bruno Galli-Valerio.

Dans deux mémoires précédents sur la rage des rats¹⁾ j'avais cité quelques cas d'infection du rat blanc, de *Mus rattus*, de *Mus musculus* et d'*Arvicola arvalis* avec du virus de la rage des rues et du virus fixe inoculés dans les muscles ou appliqués sur la peau rasée, en outre deux cas d'infection de *Mus musculus* par les morsures de *Mus rattus* enragé. Fermi²⁾, dans une note préalable, parue pendant que mon premier mémoire, daté du 4 Juillet 1905, était sous presse, signalait la sensibilité des muridés aux inoculations sous-cutanées de virus rabique. Dans des travaux successifs parus en 1906 et en 1907³⁾, ce même observateur étudiait plus complètement la réceptivité des muridés à l'infection sous-cutanée de virus rabique, surtout par l'emploi de virus fixe provenant de différents instituts.

Il arrivait à la conclusion, que les muridés peuvent être infectés de rage par inoculation sous-cutanée dans le 100 % des cas avec les virus fixes de Sassari et de Palerme⁴⁾, dans le 66 % des cas avec ceux de Rome et de Turin, dans le 36 % des cas avec celui de Florence, dans le 0 % des cas avec ceux de Bologne, de Naples et de Milan. Il faut pourtant noter, que les expériences faites avec les virus fixes de Milan et de Bologne n'ont pas de valeur, car ces virus avaient perdu de leur virulence.

Quoiqu'il en soit, les expériences de Fermi marquaient une différence très nette entre les virus fixes des îles et ceux du continent. Or comme le virus de Sassari était originaire de Turin et celui de Palerme de Naples, Fermi concluait que le virus fixe porté dans les îles y avait augmenté de virulence pour les muridés et il était même capable de tuer presque tous les cobayes et un grand nombre de lapins, chiens et chats par inoculation sous-cutanée. Mazzei à son tour⁵⁾, expérimentant à Messine sur *M. rattus* et *Mus musculus*, constatait que le virus

1) Centralbl. f. Bakt. etc. Abt. I. Orig. Bd. XL. 1905. p. 197, et Bd. XLII. 1906. p. 203.

2) Riforma medica. Vol. XXI. No. 36.

3) Giornale d. R. Soc. ital. d'igiene. 1906. (Tirage à part.) — Annali d'ig. sperim. 1907. p. 135. — Centralbl. f. Bakt. etc. Abt. I. Orig. Bd. XLIII. 1907. p. 173.

4) Pour le virus fixe de Palerme, les observations ont été consignées à Fermi par De Blasi.

5) Riv. d'ig. e san. pubblica. 1908. p. 40.

fixe de Messine, originaire de Naples, en infectait le 100%, par injection sous-cutanée, mais il obtenait les mêmes résultats non seulement avec celui de Catane, mais aussi avec ceux de Padoue et de Faenza. Au contraire celui de Milan lui donnait le 66% de résultats positifs. Mazzei n'admettait donc pas l'explication donnée par Fermi, que le virus fixe du continent se renforçait dans les îles, mais il faut pourtant noter que dans ses expériences, Mazzei avait passé tous les virus du continent 2-3 fois sur les lapins de Messine avant de les inoculer aux muridés. Les expériences de Fermi étaient plus tard confirmées à Paris par Marie¹⁾ qui, avec le virus fixe de Sassari, infectait par inoculation sous-cutanée le 100% des souris, tandis qu'avec celui de Paris il n'en infectait que le 20%; à Berlin par Schindler²⁾ qui, avec le virus fixe de Sassari, infectait par voie sous-cutanée le 100% des souris blanches et grises et le 86,66% des rats (13 sur 15), tandis qu'avec le virus fixe de Berlin il n'arrivait à infecter que le 50% des souris blanches, le 20% des grises et le 33,3% des rats (moyenne 37,6%).

Les expériences faites avec le virus fixe des îles parle donc complètement contre l'ancienne opinion de Pasteur, que plus on s'éloigne du virus des rues, moins l'inoculation hypodermique est susceptible de déterminer la rage.

Après les expériences que j'avais faites à Lausanne sur les muridés avec un virus fixe et 4 virus des rues, il était intéressant de faire quelques expériences avec le virus fixe de Sassari. Grâce à l'obligeance de mon collègue, Mr. le Prof. Fermi, que je remercie vivement ici, je recevais à Lausanne le 9 nov. 1908 du virus fixe de Sassari (lapin) conservé en glycérine. J'exposerai en détail le résultat de mes expériences, comme je l'ai fait dans mes deux mémoires précédents, pour qu'on puisse mieux se rendre compte de quelques faits importants qui en résultent et ceux qui voudront discuter mon travail auront à leur disposition tous les matériaux nécessaires pour la discussion. Toutes mes inoculations ont été pratiquées sur des animaux non soumis à la narcose. Comme dans toutes mes expériences précédentes, pour les inoculations dans le système nerveux central j'ai pratiqué l'inoculation intracérébrale et non subdurale, fixant les animaux sur ma planchette. Les rats inoculés sous la peau étaient saisis au cou avec les pinces et inoculés facilement sous la peau de la cuisse.

Exp. I: 9. XI. 08. 5h soir. Avec émulsion du virus fixe de Sassari (moëlle allongée de lapin) inoculé:

a) Dans le cerveau:

Le lapin No. 1: 13. XI. Incoordination des mouvements du train postérieur. Tremblement de la tête. 14. XI. Paralysie complète. L'animal est couché sur le flanc. 15. XI. Idem, mort dans l'après-midi.

Mus rattus No. 2: 12. XI. Triste. Se tient un peu couché sur le flanc. 13. XI. Incoordination des mouvements. Ne mord pas. 14. XI. Couché sur le flanc. Touché, réagit vivement sans pouvoir se lever. Si on approche la baguette de la bouche, il la mord. 15. XI. Mort ce matin (voir Exp. II).

b) Sous la peau de la cuisse (1 c. c. d'émulsion):

Mus rattus No. 3: 14. XI. Gêné dans les mouvements du train postérieur. 16. XI. Forte incoordination dans les mouvements du train

1) Bull. Pasteur. 1908. p. 737.

2) Zeitschr. f. Hygiene. Bd. LXI. 1908. p. 169.

postérieur. Stimulé, il s'agite, mais il ne mord pas. 17. XI. Couché sur le flanc; touché, crie. A midi, touché, ne réagit qu'en bougeant légèrement les pattes. 18. XI. Mort la nuit du 17 au 18 (voir Exp. III).

Rat blanc No. 4: 14. XI. Excité mais il ne mord pas. 16. XI. Incoordination dans les mouvements du train postérieur. 17. XI. matin. Couché sur le flanc. Touché réagit vivement et mord la baguette. 18. XI. matin. Touché, bouge à peine les pattes, soulevant un peu la tête. 19. XI. Mort la nuit du 18 au 19.

Rat blanc No. 5: 16. XI. Légère incoordination dans les mouvements du train postérieur. 17. XI. Très excité, saute dans le bocal et mord la baguette. 18. XI. matin. Forte incoordination dans les mouvements du train postérieur. Excité, saute et crie, cherchant à mordre la baguette. Après-midi il est couché sur le flanc. Touché, crie et cherche à mordre la baguette. 19. XI. matin. Idem. Réagit moins. Après-midi il ne réagit presque plus. 20. XI. Trouvé mort ce matin.

Exp. II: 16. XI. matin. Avec émulsion moëlle allongée de *Mus rattus* No. 2 (Exp. I) inoculé:

a) Dans le cerveau:

Mus rattus No. 6: 19. XI. matin. Incoordination dans les mouvements du train postérieur. Touché, ne réagit pas. 20. XI. matin. Couché sur le flanc. Touché près de la bouche, il mord la baguette. A midi il est complètement paralysé. 21. XI. Mort la nuit du 20 au 21 (voir Exp. VII).

b) Sous la peau de la cuisse:

Mus rattus No. 7 (1 c.c.): 18. XI. Incoordination des mouvements du train postérieur. 19. XI. Couché sur le flanc. Touché, bouge à peine. Il ne mord pas et meurt dans l'après-midi (voir Exp. IV).

Mus rattus No. 8 ($\frac{1}{2}$ c.c.): 8. XII. Trouvé mort le matin sans avoir présenté de symptômes. Les inoculations faites avec l'émulsion de la moëlle allongée de ce rat dans le cerveau du cobaye et du lapin n'ont pas déterminé la rage, mais les 2 animaux sont morts 24 heures après l'inoculation, complètement paralysés. Les cultures faites avec les cerveaux ont été négatives.

Rat blanc No. 9 (1 c.c.). Ce rat n'a rien présenté et a été ultérieurement inoculé (voir Exp. XXII).

Rat blanc No. 10: 22. XI. Incoordination dans les mouvements du train postérieur. 23. XI. Il est couché sur le flanc et respire à peine. Touché, bouge les pattes, mais il ne mord pas. 24. XI. Mort la nuit du 23 au 24 (voir Exp. V).

Exp. III: 18. XI. 9^h matin. Avec émulsion moëlle allongée de *Mus rattus* No. 3 (Exp. I) inoculé:

a) Dans le cerveau:

Mus rattus No. 11: 2. XII. Mort brusquement à 6 h. du soir sans avoir présenté de symptômes (voir Exp. XI).

b) Sous la peau de la cuisse (1 c.c.):

Mus rattus No. 12: 11. XII. Il est couché sur le flanc et il bouge à peine. Mort dans l'après-midi (voir Exp. XIV). Avec l'émulsion des glandes salivaires de *Mus rattus* No. 3 (Exp. I) inoculé sous la peau de la cuisse (2 c.c.):

Mus rattus No. 13: 4. XII. Mort tout à coup sans symptômes la nuit du 3 au 4 (voir Exp. XII).

Exp. IV: 19. XI. 4^h soir. Avec émulsion moëlle allongée de *Mus rattus* No. 7 inoculé:

a) Dans le cerveau:

Mus rattus No. 14: 13. XII. Légère incoordination des mouvements du train postérieur. 14. XII. Idem. 15. XII. Incoordination plus forte. Aucune tendance à mordre. 16. XII. Couché sur le flanc. 17. XII. Mort la nuit du 16 au 17 (voir Exp. XVII).

b) Sous la peau de la cuisse (1 c.c.):

Mus rattus No. 15: Il reste toujours couché sur le flanc. 25. XII. Mort dans l'après-midi (voir Exp. VI).

Exp. V: 24. XI. matin. Avec émulsion moëlle allongée du rat blanc No. 10 (Exp. II) inoculé sous la peau de la cuisse ($1\frac{1}{2}$ c.c.).

Le jeune lapin No. 16: 28. XI. Paralysie du train postérieur. L'animal se tient couché sur le flanc. Tremblement de la tête. 29. XI. Idem. 30. XI. Paralysie complète. 1. XII. Mort la nuit du 30 au 1. XII. (voir Exp. IX).

Exp. VI: 25. XI. après-midi. Avec émulsion moëlle allongée de Mus rattus No. 15 (Exp. IV) inoculé dans le cerveau.

Le lapin adulte No. 17: Il n'a rien présenté et il a été de nouveau inoculé (Exp. XXII).

Exp. VII: 21. XI. matin. Avec émulsion moëlle allongée de Mus rattus No. 6 (Exp. II) inoculé:

a) Dans le cerveau:

Le rat blanc jeune No. 18: 25. XI. Couché sur le flanc. Touché, il s'agite, mais il ne mord pas. 26. XI. Il respire à peine. 27. XI. Mort la nuit du 26 au 27 (voir Exp. VIII).

b) Sous la peau de la cuisse (1 c.c.):

Mus rattus No. 19: 21. XII. Incoordination des mouvements du train postérieur. Il ne mord pas. 22. XII. Idem. 23. XII. Paralysie. Mort à midi (voir Exp. XIX).

Exp. VIII: 27. XI. matin. Avec émulsion moëlle allongée du rat blanc jeune No. 18 (Exp. VII) inoculé:

a) Dans le cerveau:

Rat blanc No. 20: 2. XII. Couché sur le flanc complètement paralysé. Il ne mord pas. Mort à midi (voir Exp. X).

b) Sous la peau de la cuisse (1 c.c.):

Le lapin jeune No. 21: 2. XII. Incoordination des mouvements. 3. XII. Incoordination plus forte. Paralysie du train postérieur. 4. XII. Mort la nuit du 3 au 4.

Exp. IX: 1. XII. matin. Avec émulsion moëlle allongée du lapin No. 16 (Exp. V) inoculé sous la peau de la cuisse ($1\frac{1}{2}$ c.c.).

Le lapin jeune No. 22: 7. XII. Incoordination des mouvements du train postérieur. 8. XII. Couché sur le flanc. Il ne peut pas se relever. Touché, il soulève la tête sans mordre. 9. XII. Mort la nuit du 8 au 9.

Exp. X: 2. XII. après-midi. Avec émulsion moëlle allongée du rat blanc No. 20 (Exp. VIII) inoculé:

a) Dans le cerveau:

Mus rattus No. 23: 7. XII. Il est couché sur le flanc. Touché, il bouge les pattes et crie, mais il ne mord pas. Il présente une forte conjonctivite. 8. XII. Trouvé mort ce matin (voir Exp. XIII).

b) Sous la peau de la cuisse (1 c.c.):

Mus rattus No. 24: Ce rat n'a rien présenté et a été de nouveau inoculé (voir Exp. XXII).

Mus rattus No. 25: 10. XII. Couché sur le flanc. Touché, il bouge à peine. 11. XII. Mort la nuit du 10. au 11. XII.

Exp. XI: 3. XII. matin. Avec émulsion moëlle allongée de *Mus rattus* No. 11 (Exp. III) inoculé dans le cerveau:

Mus rattus No. 26: Ce rat n'a rien présenté et a été de nouveau inoculé (voir Exp. XXII).

Exp. XII: 4. XII. matin. Avec émulsion moëlle allongée de *Mus rattus* No. 13 inoculé dans le cerveau:

Mus rattus No. 27: Ce rat n'a rien présenté et a été de nouveau inoculé (voir Exp. XXII).

Exp. XIII: 8. XII. matin. Avec émulsion moëlle allongée de *Mus rattus* No. 23 (Exp. X) inoculé:

a) Dans le cerveau:

Mus rattus No. 28: 11. XII. Incoordination des mouvements. Ne mord pas. Mort brusquement à 3 h. de l'après-midi (voir Exp. XV).

b) Sous la peau de la cuisse (1 c. c.):

Le cobaye No. 29: 14. XII. Mort tout à coup la nuit du 13 au 14 sans avoir présenté de symptômes (voir Exp. XVI).

Exp. XIV: 11. XII. 3^h après-midi. Avec émulsion moëlle allongée de *Mus rattus* No. 12 (Exp. III) inoculé dans le cerveau:

Le rat blanc No. 30: Ce rat n'a rien présenté et a été de nouveau inoculé (voir Exp. XXII).

Exp. XV: 11. XII. 3^h après-midi. Avec émulsion moëlle allongée de *Mus rattus* No. 28 (Exp. XIII) inoculé dans le cerveau:

Le rat blanc No. 31: Mort à la suite d'un accident opératoire le 14. XII.

Exp. XVI: 14. XII. 9^h matin. Avec émulsion moëlle allongée du cobaye No. 29 (Exp. XIII) inoculé dans le cerveau.

Le rat blanc No. 32: 16. XII. matin. Couché sur le flanc. Il ne mord pas. Il reste dans cet état jusqu'au 19. XII. soir où il succombe (voir Exp. XVIII).

Exp. XVII: 17. XII. matin. Avec émulsion moëlle allongée de *Mus rattus* No. 14 (Exp. IV) inoculé dans le cerveau:

Le rat blanc No. 33: Mort à la suite de l'opération.

Le rat blanc No. 34: Il n'a rien présenté et a été de nouveau inoculé (voir Exp. XXII).

Exp. XVIII: 21. XII. 9^h matin. Avec émulsion moëlle allongée du rat blanc No. 32 (Exp. XVI) inoculé dans le cerveau:

Le cobaye No. 35: 24. XII. Triste. Incoordination des mouvements. 28. XII. Paralysé complètement. Mort. (Voir Exp. XX.)

Exp. XIX: 23. XII. 3^h après-midi. Avec émulsion moëlle allongée de *Mus rattus* No. 19 (Exp. VII) inoculé dans le cerveau:

Mus rattus No. 36: Il n'a rien présenté et il a été de nouveau inoculé (voir Exp. XXII).

Exp. XX: 28. XII. après-midi. Avec émulsion moëlle allongée du cobaye No. 35 (Exp. XVIII) inoculé dans le cerveau:

Mus rattus No. 37: 1. I. 09. Incoordination des mouvements. 2. I. après-midi. Paralysie. Mort (voir Exp. XXI).

Exp. XXI: 4. I. 09 matin. Avec émulsion moëlle allongée de *Mus rattus* No. 37 (Exp. XX) inoculé dans le cerveau:

Le cobaye No. 38: 7. I. Couché sur le flanc. Touché, il réagit en soulevant la tête et en bougeant les pattes, mais il ne mord pas. Mort à 2 h. après-midi (voir Exp. XXII).

Exp. XXII: 7. I. 3^{1/2} h après-midi. Avec émulsion moëlle allongée du cobaye No. 38 (Exp. XXI) inoculé dans le cerveau:

Le lapin No. 17 déjà inoculé le 25. XI. (Exp. VI). 11. I. Forte incoordination des mouvements. Tremblement de la tête. 12. I. Couché sur le flanc, il réagit à peine. Mort dans l'après-midi.

Mus rattus No. 24 déjà inoculé le 2. XII. (Exp. X). 11. I. Couché sur le flanc. Il respire péniblement. 12. I. Mort dans l'après-midi.

Le rat blanc No. 9 déjà inoculé le 16. XI. (Exp. II). 11. I. Couché sur le flanc. Il respire à peine. 12. I. Mort dans l'après-midi.

Mus rattus No. 26, déjà inoculé le 3. XII. (Exp. XI). II. I. Couché sur le flanc, respire péniblement. Mort à 5 h. du soir.

Mus rattus No. 27, déjà inoculé le 4. XII. 08 (Exp. XII). 11. I. Forte incoordination des mouvements du train postérieur. 12. I. Couché sur le flanc, respire à peine. 13. I. Mort la nuit du 12 au 13.

Le rat blanc No. 30 déjà inoculé le 11. XII. (Exp. XIV). 11. I. Forte incoordination des mouvements du train postérieure. 12. I. Couché sur le flanc. Respire péniblement. 14. I. Mort la nuit du 13 au 14.

Le rat blanc No. 34 déjà inoculé le 17. XII. (Exp. XVII). 11. I. Couché sur le flanc, respire à peine. 12. I. Mort dans l'après-midi.

Mus rattus No. 36, déjà inoculé le 23. XII. (Exp. XIX). 11. I. Forte incoordination des mouvements du train postérieur. 12. I. Mort la nuit du 11 au 12.

Si nous jetons un coup d'œil sur ces expériences, nous constatons:

1°. Que le virus fixe de Sassari, inoculé directement dans le cerveau des rats (Mus rattus No. 2 de l'Exp. I) et successivement par inoculation cérébrale de rat à rat (Mus rattus No. 6 Exp. II, rat blanc No. 18 Exp. VII, rat blanc No. 20 Exp. VIII, Mus rattus No. 23 Exp. X, Mus rattus No. 28 Exp. XIII) a toujours déterminé la rage après une incubation de 3—4—5 jours. Un lapin de contrôle (No. 1, Exp. I), inoculé en même temps que Mus rattus No. 2 dans le cerveau, a succombé aussi avec des symptômes typiques de rage après une incubation de 4 jours.

2°. Que le virus fixe de Sassari, inoculé sous la peau, a donné les résultats suivants:

a) Le virus fixe provenant directement de Sassari, inoculé (Exp. I) à M. rattus No. 3, rat blanc No. 4 et rat blanc No. 5, a déterminé chez ces animaux des symptômes de rage après une incubation de 5—7 jours. Mais les contrôles pratiqués avec la moëlle allongée et les glandes salivaires du No. 3 (Exp. III, XI, XII, XIV, XXII) n'ont pas déterminé la rage.

b) Le virus fixe de Sassari passé une fois dans le cerveau de M. rattus inoculé (Exp. II) à M. rattus No. 7, à M. rattus No. 8, au rat blanc No. 9, et au rat blanc No. 10 a déterminé des symptômes de rage après 2—5 jours chez le No. 7 et le No. 10, tandis que les No. 8 et 9 n'en ont pas présenté. Mais tandis que les contrôles faits avec la moëlle allongée du No. 7 (Exp. IV, VI, XVII, XXII) ont été négatifs, ceux pratiqués avec la moëlle allongée du No. 10 ont été positifs (Exp. V, IX).

c) Le virus fixe de Sassari passé 2 fois dans le cerveau de M. rattus, inoculé (Exp. VII) à M. rattus No. 19 l'a tué après 32 jours, mais les inoculations de contrôle avec la moëlle allongée ont été négatives (Exp. XIX, XXII).

d) Le virus fixe de Sassari passé 2 fois dans le cerveau de M. rattus et une fois dans celui du rat blanc inoculé (Exp. VIII) au lapin jeune No. 21, a déterminé les symptômes de la rage après 5 jours (pas de contrôle).

e) Le virus fixe de Sassari passé 2 fois dans le cerveau de *M. rattus* et 2 fois dans celui du rat blanc, inoculé (Exp. X) à *M. rattus* No. 24 et 25, n'a rien déterminé chez le premier (Exp. XXII), et chez le 2^d des symptômes ont apparu après 3 jours. (Point de contrôle.)

f) Avec le virus fixe de Sassari passé 3 fois dans le cerveau de *M. rattus* et 2 fois dans celui du rat blanc, inoculé (Exp. XIII) le cobaye No. 29 qui est mort tout à coup après 6 jours et les expériences de contrôle avec sa moëlle allongée ont été positives. (Exp. XVI, XVIII, XX, XXI, XXII.)

Ces résultats des inoculations sous-cutanées du virus fixe de Sassari donnent lieu à plusieurs considérations. Si dans les expériences citées on veut considérer comme infectés de rage les animaux qui ont présenté des symptômes analogues à ceux qu'on observe dans cette affection, et ceux qui n'en ont pas présenté, mais dont les inoculations de contrôle ont provoqué des symptômes de rage, nous devons dire que:

1^o. De 6 *M. rattus*, 4, (66,66 %) auraient succombé à la rage. Mais les animaux inoculés dans le cerveau avec la moëlle allongée de 3 de ces rats n'ont pas présenté la rage, et pour le 4^{me} le contrôle n'a pas été fait.

2^o. De 4 rats blancs, 3 (75 %) auraient succombé à la rage. Mais les inoculations de contrôle n'ont été faites que pour un et elles ont été positives.

3^o. Un lapin jeune a succombé avec les symptômes de la rage, mais le contrôle n'en a pas été pratiqué. A ceci, nous devons ajouter qu'un jeune lapin¹⁾ inoculé avec le virus passé sous la peau du rat blanc (Exp. V) a présenté les symptômes de la rage, et sa moëlle allongée, inoculée sous la peau d'un autre jeune lapin (Exp. IX), l'a tué avec des symptômes de rage (100 %).

4^o. Un cobaye a succombé sans symptômes, mais les inoculations de contrôle ont été positives (100 %).

Les inoculations sous-cutanées de virus fixe de Sassari ont donc donné des résultats fort incertains. Sont-ils en contradiction avec ceux obtenus par les autres observateurs? Non, si je me borne à considérer comme ayant succombé à la rage les animaux qui ont présenté les symptômes de paralysie qu'on est habitué à observer dans cette maladie inoculée aux animaux d'expérience.

En effet, j'aurais eu comme pour cents, s'il était permis de tabler sur le petit nombre d'animaux avec lequel j'ai expérimenté, méthode suivie du reste par les observateurs précédents dans quelques-unes de leurs statistiques, pour *M. rattus* 66,67 %, pour le rat blanc 75 %, pour le lapin jeune 100 %, pour le cobaye 100 %. Mais si je prends en considération le fait que dans des cas dans lesquels quelques-uns de ces animaux ont succombé avec les symptômes de la rage paralytique, les inoculations de contrôle intracérébrales ont donné des résultats négatifs, les chiffres indiqués n'ont plus qu'une valeur très relative. Malheureusement, ces résultats je ne puis pas les comparer avec ceux des observateurs qui ont expérimenté avec le virus de Sassari, de Palerme ou Messine parce que personne n'indique si des essais d'inoculation ont été faits avec la moëlle allongée des animaux ayant succombé à l'inoculation sous-

1) J'attire l'attention sur le fait que ces 3 lapins étaient des jeunes. Pergola (Riv. d'ig. e sanità pubblica. 1908. p. 421) a signalé la plus grande sensibilité des jeunes lapins à l'inoculation sous-cutanée de la rage.

cutanée de ces virus, ou si le diagnostic de rage a été fait sur les symptômes présentés par les animaux. Dans ce premier cas mes résultats se rapprocheraient de ceux de Fermi, Mazzei, Marie, et Schindler, tout en ayant pour les rats un pour cent de résultats positifs inférieur.

Mais les résultats négatifs des inoculations intracérébrales de contrôle faites avec les moëllles allongées de quelques-uns de ces animaux ayant succombé avec des symptômes rabiques ne me permettent pas d'être aussi affirmatif. Mes expériences démontrent que dans plusieurs cas l'inoculation sous-cutanée de virus fixe de Sassari, et très probablement se comportent d'une façon analogue les virus fixes de Messine et de Palerme, tout en déterminant chez les animaux des formes paralytiques, ne déterminent pas la rage, mais une forme fort analogue à celle qui a été observée plusieurs fois chez les personnes soumises au traitement Pasteur après morsure.

Dans ces formes paralytiques du traitement, si nous faisons exception d'un cas dans lequel Franzius aurait pu provoquer la rage chez le lapin par l'inoculation de la salive d'une personne paralysée, tous les autres observateurs n'ont pas eu de résultats positifs par l'inoculation. Pour cette raison, Nedrigailoff et Ostrjanin¹⁾, Babes et Mironesco²⁾, Remlinger³⁾ attribuent la paralysie du traitement à une substance toxique (toxine rabique?) qui se trouverait associée au virus fixe. Il est probable que dans des virus fixes très actifs, tels que celui de Sassari, cette substance toxique soit plus active ou en plus grande quantité et son action se manifeste dans les inoculations sous cutanées, à cause de la quantité plus grande de virus inoculée ($\frac{1}{2}$ —1—1 $\frac{1}{2}$ c. c.) en comparaison de celle qu'on inocule dans le cerveau (une petite goutte), et peut-être à cause du fait que cette substance toxique est plus facilement resorbée par la voie sous-cutanée que le virus rabique lui-même.

S'il en est ainsi, mes expériences portent de la lumière dans la pathogénie des paralysies du traitement.

Je noterai que dans quelques-uns des cas à type toxique que j'ai indiqués, cas qui présentaient tous forte hyperémie du système nerveux central j'ai pratiqué sur des frottis de la corne d'Ammon la recherche des corps de Negri, mais elle a été complètement négative. Des recherches sur les coupes seront faites plus tard.

Quoi qu'il en soit, j'attire vivement l'attention de tous ceux qui auront l'occasion de travailler avec du virus fixe de Sassari ou des virus analogues sur les phénomènes que j'ai observé.

Les symptômes observés chez les rats, lapins et cobayes inoculés avec du virus fixe de Sassari et ayant contracté la rage, ont été ceux de la forme paralytique, dans quelques cas avec légère excitation. A ce point de vue, le virus fixe de Sassari s'est comporté comme le virus fixe de Turin et pas comme les virus des rues qui, comme on peut le constater dans mes deux mémoires précédents, provoquèrent surtout chez *M. rattus*, la rage furieuse dans la grande majorité des cas.

Dans un cas (*M. rattus* No. 23, Exp. X) j'ai noté une très forte conjonctivite, fort analogue à celle observée par Remlinger et par Schindler⁴⁾ chez les souris enragées.

1) Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Ref. Bd. XXXIX. p. 731.

2) Sem. méd. 1908. p. 287.

3) Annales de l'Inst. Pasteur. 1905. p. 625.

4) Schindler, Travail cité.

Conclusions générales.

Si les inoculations sous-cutanées de virus fixe de Sassari peuvent dans certains cas déterminer la rage chez *M. rattus*, rat blanc, jeune lapin et cobaye, il y a certainement des cas où les symptômes paralytiques observés chez les animaux inoculés ne sont pas dûs à la rage car l'inoculation intracérébrale de la moëlle allongée de ces animaux ne donne pas la rage. Il s'agit ici très probablement de formes paralytiques par intoxication, analogues à celles qu'on observe au cours du traitement antirabique après morsure. Les constatations que j'ai faites, si elles sont confirmées, feront toujours plus écarter l'origine rabique des formes de paralysie du traitement.

Lausanne, 9 février 1909.

Nachdruck verboten.

Ueber die Filtration des Staupecontagiums.

[Aus dem hygienischen Institut der Kgl. tierärztlichen Hochschule zu Berlin (Leiter: Geh. Med.-Rat Prof. Dr. Frosch).]

Von Dr. Curt Kregenow, Tierarzt.

Einleitung.

Seitdem im Jahre 1875 Semmer die ersten Mitteilungen über bakterioskopische Untersuchungen zur Erforschung der Natur des Staupeerregers veröffentlichte, hat es, wie v. Wunschheim (6) sagt, an Bemühungen, den Erreger dieser verheerenden Krankheit aufzufinden, nicht gefehlt, und wenn man die dieser Frage gewidmete Literatur — diesbezüglich verweise ich auf die Arbeiten von Richter-Dessau (5) und von v. Wunschheim-Innsbruck — überblickt, so zeigt sich, daß fast jeder Beobachter einen anderen Erreger verantwortlich macht, und daß Bakterien, deren Form und kulturelles Verhalten durchaus untereinander verschieden sind, als die Erreger der Hundestaupe bezeichnet werden.

Während alle bisherigen Forscher mikroskopisch sichtbare Bakterien für die Erreger ansprechen, nimmt Carré (1) auf Grund eigener Untersuchungen einen abweichenden Standpunkt betreffs der Klassifizierung des Staupeerregers ein, den er in die Gruppe der bakteriendichte Filter passierenden Mikroben rechnet.

Carré (1) hat in seiner ersten, dies Thema behandelnden Arbeit folgende Untersuchungen angestellt:

Da die verschiedenen Autoren betreffs der Ansteckungsfähigkeit des Auswurfes ziemlich einig sind, hat auch Carré dieses pathologische Produkt benutzt, aber nicht das in reicher Fülle aus den Nasen der Tiere während der letzten Periode ausfließende schleimig-eitrige Sekret, sondern er hat in einem früheren Stadium, am Beginn der Affektion, einige Tropfen zweifelhaften Schleimes gesammelt, die er durch Drücken auf die Nasenlöcher erhielt.

Bei der mikroskopischen Untersuchung zeigte dieses Produkt einige wenige Leukocyten, wenig oder gar nicht verändert, rote Blutkörperchen und Epithelzellen, mit verschiedenen Mikroben vollgestopft, die er auch gleichmäßig frei im Schleim wiederfand.

Die Verimpfung der beiden Tropfen dieses Auswurfes an einen jungen Hund tötete diesen in 5–6 Tagen ohne Lokalaaffektionen an der Impfstelle.

Um einen so schnellen Tod zu erklären, vermutete Carré in dem verimpften Produkt die Gegenwart eines pathogenen Agens, das mit einer genügend großen Virulenz behaftet war, um das Tier durch Septikämie zu töten.

Die direkte Prüfung des Blutes blieb aber negativ; Carré fand in ihm bei der mikroskopischen Untersuchung keine Mikroben.

Daraufhin schlug er einen anderen Weg ein, das Contagium nachzuweisen; die Filtration des Auswurfes und die Verimpfung des Filtrates.

Den Auswurf löste Carré in sterilisiertem Wasser und filtrierte ihn durch ein sehr poröses Filter „mais néanmoins de grain assez serré pour retenir tous les microbes visibles“¹⁾.

Das erhaltene Filtrat war von absoluter Klarheit und blieb, auf die gebräuchlichen Nährböden übergepflanzt, steril. Indessen erhielt Carré, als er diese Flüssigkeit jungen Hunden einimpfte, folgende interessante Resultate:

Nach Verlauf von 3–4 Tagen stieg die Temperatur; sie erreichte schnell 40–41° C, und hielt sich in dieser Höhe 2–3 Tage. Zu diesem Zeitpunkt wurden die Augen tränenreich, und das Tier bekam Nasenausfluß. Zuweilen war ein wenig rauher Husten zu hören. Nach Verlauf von 8–10 Tagen erschienen am Hinterleib, an den Schenkeln und in den Achselhöhlen große Pusteln. Die Entzündung nahm mit einer verschiedenen Intensität und Schnelligkeit zu. Der wenig reichliche, seröse Ausfluß wurde schleimig-eitrig und floß andauernd. Zuletzt starb das Tier an Bronchopneumonie.

Abhängig vom Alter und von der Rasse und wahrscheinlich auch von der Quantität des verimpften Virus, war bei Carrés Versuchen der Gang der Affektion mehr oder weniger schwer. Die thermische Erhöhung fehlte niemals, der Nasenausfluß und die Pusteln waren frequent, das Ende ohne Ausnahme tödlich.

In einem anderen Versuch entnahm Carré einem Hunde während der Höhe des Fieberanfalles Blut und filtrierte es. Das Filtrat, an ein neues Tier verimpft, erzeugte dieselben Symptome, thermische Erhebung, Nasenausfluß und Pusteln. Das Filtrat war nachgewiesenermaßen keimfrei²⁾.

Die auf diese Weise infizierten Tiere waren auch stets imstande, neue mit ihnen in Berührung gebrachte Hunde zu infizieren.

Auf Grund dieser Versuche glaubt Carré berechtigt zu sein, den Erreger der Hundestaupe unter die Reihe der filtrierbaren Virusarten zu rechnen.

In seiner zweiten Arbeit bringt Carré (2) folgende Ergebnisse seiner weiteren Forschungen:

Er berichtet über gewisse Verletzungen, die ihm bei der Beobachtung von an natürlicher wie an experimenteller Krankheit gestorbenen Hunden begegnet sind, ferner über die Virulenz gewisser pathogener Produkte, über den symptomatischen und ätiologischen Wert der bläschenartigen Pusteln, und endlich über die enge Annäherung, die er herbei-

1) Nähere Einzelheiten über die Beschaffenheit der von ihm benutzten Filter, sowie Angabe der Firma oder der Bezugsquelle fehlen in der Arbeit Carrés.

2) Auch hier fehlen nähere Angaben über die Aufenthaltsdauer des Filtrates im Brutschrank.

geführt hat, um zwischen der Hundestaupe und einer anderen, besser bekannten, dem aphthösen Fieber, zu operieren.

Zunächst bringt Carré einige unwesentliche Angaben über den Krankheitsverlauf junger Hunde, die er mit zwei Tropfen des serösen Ausflusses geimpft hat, und die am 6.—7. Tage im vollkommenen Koma starben.

Sodann folgen Angaben über den Sektionsbefund.

Verletzungen der äußeren Decke waren nicht vorhanden; als einziger Befund fand sich ein einfacher, perikarditischer Erguß, gelbklar und gering (1—3 ccm).

Diese wässerige Flüssigkeit zeigte sich, selbst in großer Quantität auf die verschiedenen Nährböden übergepflanzt, in allen Fällen steril. Indessen, in der Dosis von einigen Tropfen auf einen neuen Hund übergeimpft, tötete sie ihn in derselben Zeit, mit denselben Symptomen, derselben thermischen Kurve und derselben Verletzung, wie sie für die Infektion durch den Auswurf charakteristisch war.

Nahm Carré an Stelle einer schnell tödlich wirkenden Dosis, Auswurf oder perikarditische Flüssigkeit, eine Lösung dieser selben virulenten Produkte, so erhielt er nicht mehr diese „foudroyante“ Form.

Carré beschreibt den Verlauf wie folgt:

„Nach einem Inkubationsstadium von 4—5 Tagen steigt die Temperatur rapide auf 40 und 41° C, dann erscheint der Auswurf, einige Tropfen Schleim entfließen den Nasenlöchern, Eiterbläschen entstehen in verschiedener Anzahl an auserwählten Stellen, das Tier hustet, wenn es sich legt; es nimmt stark ab. Die Perkussion verrät zuweilen ein mehr oder weniger reichliches, pleuritisches Exsudat. Endlich, 15 Tage bis 3 Wochen nach Beginn der Affektion, findet man das Tier tot in seinem Käfig.

In diesem besonderen Falle hat die Krankheit ihren normalen Weg verfolgt, und die Verletzungen, die wir soeben konstatiert haben, werden absolut diejenigen sein, die man bei den Tieren antrifft, die an der natürlichen Krankheit gestorben sind.

Ich berufe mich nicht auf die pulmonären und pleuralen Verletzungen; diese sind seit langem bekannt und beschrieben. Aber ich muß mich über die Veränderungen verbreiten, die sich auf das Myokard und auf die Gegenwart eines pleuritischen Exsudates beziehen, Veränderungen, die bisher noch nicht beschrieben worden sind.

Das Herz ist in der Tat oft betroffen. Man findet an ihm hämorrhagische Flecken, gelbe, schlecht abgegrenzte, dünne „plaques“ oder noch, bei sehr jungen Versuchstieren, gelbe Herde, abgerundet, linsenförmig, sich in die Dicke des Myokardiums eingrabend.

Auf der Höhe der Krankheitserscheinungen sind die Muskelfibrillen verändert und von einer reichlichen, leukocytären Infiltration überschwemmt.

Wie bei der heftigen Form der Affektion und mitunter in ziemlich großer Menge findet man perikarditische Flüssigkeit, aber im allgemeinen ist dieses Exsudat nicht mehr virulent.

Es scheint, daß man, je länger der Tod nach der Infektion dauert, weniger Chancen hat, ein aktives Exsudat zu finden.“

Das waren die Ergebnisse Carrés an seinen Versuchshunden; jetzt untersuchte er Tiere, die an der natürlichen Krankheit gestorben waren, und fand dieselben Erscheinungen wie bei der experimentellen Affektion, namentlich die interessantesten und typischsten, Myokarditis

und perikarditischen Erguß mit all ihren Charakteren und Eigentümlichkeiten.

„Wie ich voraussah“, schreibt Carré weiter, „ist es nur eine Ausnahme, wenn das perikarditische Exsudat sich virulent zeigt, und in den Fällen, wo ich diese Virulenz konstatiert habe, stammte das Exsudat nachweislich von Tieren im Anfangsstadium der Krankheit, zu einer Zeit, wo die pulmonären Veränderungen nicht vorhanden sind oder wenig in Betracht kommen.“

Ich habe in meiner ersten Veröffentlichung gesagt, daß sich durch die mikroskopische Prüfung des Blutes von Tieren, die schnell durch die Infektion von Auswurf getötet wurden, kein färbbarer Mikrobe nachweisen ließ.

Die breite Verimpfung von Blut auf Gelatine zeigt indessen mitunter einige seltene Kolonien eines Micrococcus, den ich mit demjenigen habe identifizieren können, den man bei reiner Beschaffenheit in den Eiterpusteln der Haut gefunden hat.

Prof. Trasbot hatte diese Pusteln zum pathognomischen Symptom der Krankheit gemacht. Man muß anerkennen, daß dieser Gedanke eine experimentelle Stütze zu finden scheint.

Trasbot impfte den Inhalt einer Pustel auf einen neuen Hund über und erzeugte andere Pusteln.

Das, was Trasbot mit dem Eiter gemacht hat, führte Kitt mit den Reinkulturen des betreffenden Mikroben aus, der zum ersten Male von Mathis im Jahre 1887 isoliert worden ist.

Die Eiterpustel des Hundes enthält in der Tat im reinen Zustand einen Micrococcus, der sich im Eiter besonders unter der Form des Diplococcus darstellt und Kulturen ergibt, die denen des gewöhnlichen Staphylococcus ähnlich sind.

Alle Autoren, die in den Pusteln das spezifische Agens der Krankheit gesucht haben, haben diesen Micrococcus isoliert und beschrieben (Mathis, Marcone und Meloni, Jacquot und Legrain).

Kitt hat nicht allein gezeigt, daß die Verimpfung dieses Micrococcus die Ursache von Pusteln war, sondern auch, daß Hunde als Folge der Impfung keine Immunität gegen die Krankheit erwarben.“

Carré hat diese Resultate bestätigen können, und zwar durch folgenden Versuch: Er injizierte einem Hund 1 ccm der Mikrokokkenkultur unter die Haut des Schenkels. Es bildete sich rasch eine warme, ausgebreitete Infiltration, und nach Verlauf von einigen Tagen zeigten sich zahlreiche, typische Eiterpusteln auf der Oberfläche der Haut. Indessen zog sich derselbe Hund, später mit der perikarditischen Flüssigkeit geimpft, einen schweren Anfall der Krankheit zu.

Der Micrococcus der Pusteln ist, wie Carré nachgewiesen hat, ein gewöhnliches Agens, das normal im Darme des Hundes vorkommt.

Wenn die Pusteln auch unter den natürlichen Bedingungen ihres Erscheinens als ein gewisses und häufiges Zeichen der Krankheit betrachtet werden können, so bilden sie keineswegs ein spezifisches Symptom dieser Affektion.

Carré hat nachgewiesen, daß die Pusteln beim Hunde ebensogut im Verlaufe einer Infektion auftreten können, die durch ein filtrierbares Virus hervorgerufen wird, das von dem der Staupe verschieden ist. Er hat durch Verimpfen von aphthösem Virus einen Hautausschlag erhalten, der chemisch und bakteriologisch mit demjenigen der „maladie du jeune âge“ identisch ist. Als dieser aber abgeheilt war, zeigte sich

bei einer Verimpfung von Staupevirus eine neue Eruption. Umgekehrt war es möglich, bei jungen Hunden zwei aufeinanderfolgende Eruptionen zu erhalten, von denen die erste durch die Infektion mit dem ultravisiblen Erreger hervorgerufen wurde, während die zweite die Folge einer aphthösen Infektion war.

Ueberdies hat Carré oft festgestellt, daß die „porcelets aphteux“ außer den spezifischen Aphthen eine kutane Eruption zeigten, die mit derjenigen, die man bei Hunden als Wirkung der Krankheit antrifft, ähnlich ist.

Carré glaubt also, daß man das Virus der Hundestaupe wegen aller seiner Eigenschaften mit dem Virus des apthösen Fiebers vergleichen kann.

Die dritte Arbeit Carrés bringt folgendes:

Das Virus der Krankheit ist so in der Außenwelt verbreitet, daß der Autor gezwungen war, um seine Versuche zu verwirklichen, seine neuen Tiere unter den strengsten Trennungsmaßregeln aufzuziehen und zu erhalten¹⁾.

Der sicherste und gewöhnlichste Infektionsmodus für die natürliche Krankheit ist nach Carrés Ueberzeugung die Aufnahme durch den Verdauungstraktus²⁾.

Das Inkubationsstadium betrug, gleichviel welcher Infektionsmodus vorlag, 2–5 Tage. Das erste Symptom war das Fieber.

„Wenn das Tier sehr jung und die Dosis stark genug ist, erfolgt der Tod in wenigen Tagen, und das alleinige Symptom besteht in einer virulenten perikarditischen Ansammlung. Ist aber das Tier widerstandsfähig, so entwickelt sich die Krankheit in ihrer klassischen Form.

Das Blut ist, auf der Höhe des Fieberanfalles gesammelt, steril, erzeugt aber die Krankheit.

Sehr rasch erscheinen Komplikationen auf der Haut (Bläschen, Pusteln), an den Schleimhäuten (virulenter Schnupfen), auf den serösen Häuten (virulentes Exsudat), an den inneren Organen (Myokarditis, Hepatitis etc.).

Wenn die Exsudate lange genug von jeder Sekundärinfektion frei bleiben, so entstehen keine anderen Läsionen.“

Die gewöhnlichste Sekundärinfektion ist die Bronchopneumonie, und diese hat Carré besonders studiert. Aus den Herden der Pneumonie hat er verschiedene Mikroben isoliert, von denen einige als spezifisch betrachtet werden, besonders die Pasteurella von Lignières, den Coccus von Mathis und den Bacillus von Perez etc.

Es war Carré unmöglich, für jeden dieser Mikroben eine bestimmte spezifische Eigentümlichkeit in dem Hervorbringen der Läsionen nachzuweisen. Die Mikrobenflora war eine sehr veränderliche, außer für die Hautpusteln, in denen Carré immer den Coccus von Mathis gefunden hat.

In die Gewebe eines jungen Hundes injiziert, zeigten sich diese Mikroben von einer ziemlich starken Virulenz; was sie aber von dem Filtermikroben unterschied, war der Umstand, daß ihre Absorption von den Verdauungswegen merkwürdigerweise vertragen wurde.

1) Nähere Angaben über die Kautelen zur Verhütung einer Spontaninfektion seiner Hunde fehlen auch hier.

2) Diese Annahme Carrés ist meines Erachtens unwahrscheinlich, denn in fast allen Fällen deutet das Auftreten von Krankheitssymptomen zuerst am Respirationsapparat (Nasenausfluß, Husten) darauf hin, daß der gewöhnliche Infektionsmodus die Aufnahme des Contagiums durch die eingeatmete Luft ist.

Carré hat 6 Monate lang unter die Nahrung von 6 jungen, isolierten Hunden reichliche Kulturen (18 l) der sehr virulenten „Pasteurella canine“ gemengt, die er aus der Pneumonie eines Hundes isoliert und ohne Tierpassage gezüchtet hatte.

Diese Hunde sind immer ausgezeichnet gesund geblieben. Einer von ihnen hat sich, als er in einem infizierten Käfig untergebracht worden war, sehr schnell die Krankheit zugezogen. Er hatte also keine Immunität erworben.

Diese Sekundärmikroben stammten aus der Außenwelt; Carré konnte sie leicht aus dem Darm und aus den natürlichen Körperöffnungen gesunder und kranker Hunde isolieren.

„Die Hundestaupe scheint also eine Krankheit von zusammengesetzter Aetiogenie aufeinanderfolgender Infektionen zu sein, zwischen denen ein enger Zusammenhang besteht.“

Das erste, allein spezifische Symptom ist nach Carré dem filtrierbaren Virus zuzuschreiben, das, noch dazu von einer eigenen pathogenen Wirkung, die bemerkenswerte Eigenschaft besitzt, die phagocytäre Gegenwehr infizierter Tiere fast vollständig aufzuheben und so verschiedenen anderen Mikroben, die sekundäre, nicht spezifische Verletzungen hervorrufen, den Weg frei zu machen. Man kann mitunter diese sekundären Verletzungen an einem neuen Tier hervorbringen, aber nur unter Benutzung künstlicher Experimente (Ueberimpfung, Kälte-wirkung etc.). Jedenfalls sind dies nicht die natürlichen Bedingungen ihres Erscheinens.

In der Tat genügte es, wie Carré nachgewiesen hat, ein neues Tier mit dem reinen filtrierbaren Virus zu infizieren, um zu sehen, daß sich bei ihm die gewöhnlichen Komplikationen der natürlichen Affektion entwickeln, und um in den sekundären Läsionen Mikroben zu konstatieren, die er nicht in den Organismus eingeführt hatte, deren Anwesenheit er aber im Darm und in den natürlichen Körperhöhlen des Hundes erfahrungsgemäß vor der spezifisch experimentellen Infektion nachweisen konnte.

„Die Staupe bildet keine Ausnahme. Es gibt noch andere Krankheiten, bei denen man als spezifische Infektionserreger Mikroben betrachtet, die normal beim gesunden Tiere vorkommen.“

Es ist wahrscheinlich, daß die pathogene Wirkung dieser Mikroben nur ermöglicht wird durch die einfache und unumgängliche Vermittlung eines ultravisiblen Virus.“

Zu den Forschungen Carrés äußert sich Lignières (4) in demselben Jahre (1906) in der „Société centrale de médecin vétérinaire“.

Er konnte durch Nachprüfung die Richtigkeit jenes Forschers im großen und ganzen bestätigen, und kommt am Schlusse seiner ausführlichen Darlegungen, die auf eigenen Versuchen und vergleichenden Untersuchungen basieren, zu nachstehenden Folgerungen:

„Es existiert in den krankhaften Absonderungen und Säften der Hunde, welche von der Staupe befallen sind, der durch Carré nachgewiesene spezifische Mikrobe. Derselbe vermag die Filter zu passieren, entwickelt sich nicht in unseren gewöhnlichen Medien und scheint der Haupterreger der Staupe zu sein. Neben diesem filtrierbaren Mikroben und unter dem Schutze seiner deprimierenden Tätigkeit können ihm verbundene Mikroorganismen tätigen Anteil an den Formen und Komplikationen der Staupe nehmen. Indessen können außer den Filtermikroben gleichfalls andere Mikroben allein, wenn auch seltener, Symptome und

Läsionen hervorrufen, die man bisher bei der Staupe untergebracht hat; zu ihnen gehören der *Bacillus ozaena foetidus* und die *Pasteurella canis*. Die letztere kann bei den Fleischfressern entweder allein, d. h. ohne Mitwirkung des Filtermikroben, oder im Verein mit ihm und anderen Mikroben vorkommen. Es würde von Nutzen sein, unmittelbar durch einen besonderen Namen, etwa den der „Hundepest“ die Hundekrankheit genau zu bezeichnen, deren ursprünglichste und wesentlichste Ursache der Mikrobe von Carré ist.“

Aus diesen Angaben geht hervor, daß sich die Widersprüche hinsichtlich der Aetiologie der Hundestaupe auch auf den prinzipiell wichtigsten Punkt erstrecken, ob die Krankheit durch ein visibles oder ein ultravisibles Virus hervorgerufen wird.

Es schien daher der Versuch notwendig, zuerst über diesen Punkt Klarheit zu verschaffen.

Deshalb wurde mir von Herrn Geh. Medizinalrat Prof. Dr. Frosch die Aufgabe erteilt, festzustellen, ob das Staupecontagium gemäß den Angaben Carrés filtrierbar ist, und ob, mit Rücksicht auf die Differenz in den Angaben des Autors, die Art der Filter eine Rolle spielt.

Erst nach dem Abschluß meiner Untersuchungen erfuhr ich, daß Dr. v. Wunschheim Anfang 1908 einige Versuche bezüglich der Filtrierbarkeit des Staupevirus gemacht, seine Resultate aber noch nicht veröffentlicht hat.

Mit gütiger Erlaubnis des Herrn Dr. v. Wunschheim bringe ich hier kurz seine Resultate.

v. Wunschheim benutzte zweimal das Hirn eines an nervöser Staupe und einmal die Lunge eines an Pneumonie gestorbenen Hundes und filtrierte das Material durch Reichelkerzen.

Während der Kontrollhund, der mit einer Emulsion von Lungenmaterial durch Inhalation infiziert worden war, nach einem Inkubationsstadium von 15 Tagen erkrankte, blieben die Versuchshunde, die 37—39 Tage hindurch beobachtet wurden, gesund. Einem dieser Hunde war das Filtrat subkutan, den anderen beiden durch Inhalation appliziert worden.

Allgemeines.

Meine Untersuchungen erstrecken sich auf folgende Filtersorten, die ich von der Firma F. und M. Lautenschläger bezog:

- 1) Nordtmeyer, Berkefeld-Original, 100 mm lang;
- 2) Chamberland, Marke F, 100 mm lang;
- 3) Reichel (Berliner Fabrikat), 100 mm lang;
- 4) Pukal (Königl. Porzellan-Manufaktur), 50 ccm.

Die für meine Versuche nötigen Hunde bezog ich von einem hiesigen Händler. Um sicher zu sein, daß die Hunde die Krankheit noch nicht durchgemacht hatten, benutzte ich nur Hunde im Alter von ca. 8—14 Wochen; nur in 2 Fällen waren die Hunde 18 Wochen bez. $\frac{1}{2}$ Jahr alt.

Alle Hunde wurden bei ihrer Einlieferung untersucht und erst nach einer bestimmten Quarantänefrist zu Impfungen verwendet.

Zur Ernährung dienten Milch, Brot und Pferdefleisch. Die Tiere wurden 2 mal täglich gefüttert, und zwar die Versuchs- und die Kontrollhunde getrennt von je einem Wärter, um eine Spontaninfektion durch die Fütterung zu verhindern.

Bei der Impfung beobachtete ich folgende Vorsichtsmaßregeln, abgesehen von denen, die die bakteriologische Technik vorschreibt.

Um die Impfungen einwandfrei zu gestalten, wollte ich, da ich durch das Arbeiten mit virulentem Material stets infiziert war, die Impfungen nicht selbst vornehmen. Sie wurden in meiner Anwesenheit von einigen Kollegen unter den strengsten aseptischen Kautelen ausgeführt, und auch hierbei eine Trennung zwischen Versuchs- und Kontrollhunden durchgeführt derart, daß immer zuerst der Versuchshund mit filtriertem, dann der Kontrollhund mit unfiltriertem Material geimpft wurde.

Als Applikationsmethoden wählte ich:

- 1) die subkutane Impfung beiderseits hinter dem Schulterblatt.
- 2) Die langsame, tropfenweise Applikation in beide Nasenlöcher.
- 3) Einträufeln in die Augen.
- 4) Die Applikation per os.

Die ersten 3 Methoden wurden bei allen Hunden gleichzeitig angewendet, alle 4 Methoden gleichzeitig bei 3 Versuchen (II. IX. X.).

Während der Filtration des Materiales und während des Aufenthaltes des Filtrates im Brutschrank zur Kontrolle auf Keimfreiheit bewahrte ich die zurückbehaltene, unfiltrierte Kontrollmenge auf Eis (im Frigo) auf. Trotzdem geschah es einmal (s. Versuch VII, VIII und IX), daß das Kontrollmaterial bei der Verimpfung etwas nach Fäulnis roch. Da aber die betr. Kontrollhunde an der typischen Staupe eingingen, so ist anzunehmen, daß das Staupecontagium durch Fäulnis, wenigstens soweit sie bei dem in Frage kommenden Material vorhanden war, nicht beeinflußt wird.

Die Filtrate ließ ich 2—4 Tage im Brutschrank, da 24 Stunden nicht immer genügten, um etwa vorhandene Keime zur Entwicklung zu bringen.

Bei der Beobachtung der geimpften Tiere verwendete ich die größte Vorsicht. Um eine Infektion durch Spontanübertragung zu verhüten, nahm ich die Temperatur nur selten auf, jedenfalls nicht früher, als bis die Krankheit offensichtlich zum Ausbruch gekommen war. Sonst vermied ich jede Berührung mit den Hunden.

Im Verlauf meiner Versuche bemühte ich mich, eine Methode zur Reinigung gebrauchter Filter zu finden. Da die Filter durch das Ausglühen meist unbrauchbar werden, versuchte ich es auf folgende Weise, mit der ich befriedigende Resultate erzielte.

Gleich nach der Benutzung eines Filters ließ ich klares Wasser hindurchfiltrieren. Dann filtrierte ich eine 1-proz. Schwefelsäurelösung rückwärts — d. h. von außen nach innen und auf demselben Wege zum Nachspülen und Entfernen der Schwefelsäure klares Wasser hindurch. Nach nochmaligem Durchfiltrieren von klarem Wasser von innen nach außen — zur Prüfung auf die Durchlässigkeit der Poren — und Auskochen während einer halben Stunde waren die Filter so gereinigt, daß ich mehrere Versuche mit demselben Filter anstellen konnte. Diese Reinigungsversuche erstreckten sich auf Reichel-, Chamberland- und Berkefeld-Filter. Wegen der Form der Pukalfilter konnte die Methode bei dieser Filtersorte nicht angewendet werden.

Im Institut wurden mit dieser Methode, gelegentlich von Toxinfiltrationen, auch von anderer Seite befriedigende Resultate erzielt.

Aus der Beschreibung meiner Versuche möchte ich das Ergebnis bei der Verwendung einer Filtersorte vorwegnehmen. Mit Berkefeld-filtern ist es mir bei im ganzen 10 Versuchen nicht einmal gelungen, ein steriles Filtrat zu erhalten, trotzdem ich alle erdenklichen Vorsichts-

maßregeln zur Abwehr von Luftkeimen anwendete. Die Flüssigkeit pasierte jedesmal das allem Anscheine nach äußerst poröse Filter mit einer Schnelligkeit, die es leicht erklärlich macht, daß das Filter nicht imstande war, alle visiblen Bakterien zurückzuhalten. Hierbei muß ich erwähnen, daß ich bei der Filtration durch Berkefeldfilter im Gegensatz zu anderen Filtersorten (3 Atm.) nur einen Wasserdruck von 2 Atmosphären wirken ließ. Die am Ausgang des Filters erscheinende Flüssigkeit war, was die Klarheit betrifft, kaum merklich von dem unfiltrierten Material zu unterscheiden. Merkwürdig war es, daß die filtrierende Flüssigkeit stets schaumig, also mit Luftbläschen untermischt war — trotzdem das Filter ganz von Flüssigkeit bedeckt und durch Paraffin luftdicht abgeschlossen war — und nicht in Tropfenform wie bei den anderen Filtersorten das Filter verließ.

Meist genügte schon ein 18—24-stündiger Aufenthalt im Brutschrank, um die im Filtrat vorhandenen Keime zu reichlicher Entwicklung zu bringen.

Im Glauben, den Fehler in der Beschaffenheit der Filtermasse suchen zu müssen, wiederholte ich meine Versuche mehrmals mit neuen, ungebrauchten Filtern, aber ebenfalls ohne den gewünschten Erfolg, so daß ich auf einen Impfversuch mit Berkefeld-Filtrat verzichten mußte.

Eigene Versuche.

Zur Gewinnung von Material brachte ich einen 8 Wochen alten, gesunden, staupefreien und nachweislich früher nicht an Staupe erkrankten Hund im Käfig mit einem an der katarrhalischen Form der Staupe schwer erkrankten Hunde zusammen. Nach einem Inkubationsstadium von 7 Tagen traten die ersten Krankheitserscheinungen auf, Augen- und Nasenausfluß. Im weiteren Verlauf von 7 Tagen kamen Husten und Erbrechen hinzu, Augen- und Nasenausfluß wurden eitrig und kopiös. Durch Drücken auf die Nasenlöcher gelang es mir, eine genügende Menge eitrigem Ausflusses zu gewinnen für meinen

I. Versuch.

Diesen Ausfluß vermengte ich mit steriler Kochsalzlösung und ließ diese Mischung $\frac{1}{2}$ Stunde lang im elektrischen Schüttelapparat schütteln. Die auf diese Weise erhaltene Emulsion war aber für eine Filtration wegen ihrer zähen Beschaffenheit noch ungeeignet. Erst die Vorfiltration durch Fließpapier ermöglichte es, die Flüssigkeit durch ein Filter zu schicken.

Zur Filtration benutzte ich ein Reichefilter.

Das Filtrat blieb nach 48-stündigem Aufenthalt im Brutschrank steril. Impfung am 28. Okt. 1908.

I. Versuchshund, männl. Bastard, ca. 10 Wochen alt. 1 ccm subkutan, 1 ccm in die Nase.

Unterbringung: In einem eisernen Käfig im Kleinviehstall I.

Verlauf der Impfung: Bei dem Tiere zeigten sich keinerlei Krankheitserscheinungen, es blieb munter und zeigte guten Appetit.

Da bis zum 3. Dez. — also nach einer 36-tägigen Beobachtungszeit — keinerlei Krankheitserscheinungen vorlagen, und eine Infektion infolge der Impfung jetzt nicht mehr in Betracht kam, wurde am 3. Dez. der mit virulentem Material geimpfte Kontrollhund No. Xa in demselben Raume untergebracht. Am 7. Dez. war der Versuchshund (I) infolge seines matten Benehmens verdächtig, doch konnte ich erst am 10. Dez.

die sichere Diagnose stellen, weil an diesem Tage deutlicher Appetitmangel, Augen- und Nasenausfluß vorlagen. Die Symptome steigerten sich in den nächsten Tagen und führten unter starker Diarrhœe und Abmagerung des Patienten am 17. Dez. zum letalen Ausgang.

Inkubationsstadium: 7 Tage.

Sektion am 17. Dez. 10 h. a. m.

Im Bauchraum ziemlich viel rötlich gefärbte, klare Flüssigkeit. Der ganze Darmtractus zeigt das Bild einer hochgradigen Entzündung, Schwellung der Darmschleimhaut und diffuse Hämorrhagieen. Leber brüchig. Milz blaß und trocken. In der Lunge einige wenige pneumonisch infiltrierte Herde.

Diese Erkrankung liefert gleichzeitig den Beweis, den ich bei den anderen gesund gebliebenen Versuchshunden durch eine Kontrollimpfung erbrachte, daß der betreffende Hund, trotzdem er auf die Impfung nicht reagierte, doch für die Krankheit empfänglich war.

Ia. Kontrollhund, männl. Bastard, ca. 10 Wochen alt; erhielt am 28. Okt. dieselben Dosen von unfiltriertem Material.

Unterbringung: In einer großen, mit Stroh ausgelegten Holzkiste in einem staupefreien Pferdestall (I).

Verlauf der Impfung:

3. Nov. Patient ist nicht mehr munter, frißt aber mit Appetit; beiderseitiger Augen- und Nasenausfluß.

5. Nov. Mangelnder Appetit, Durchfall; die Nachhand erscheint etwas gelähmt; die Bewegungen der Hintergliedmaßen sind beeinträchtigt.

6. Nov. Augen- und Nasenausfluß sind schleimig-eitrig geworden. Das Tier hustet etwas.

7. Nov. Die Augen sind völlig verklebt, das Tier liegt teilnahmslos auf seinem Lager und reagiert nicht mehr auf Anruf.

8. Nov. Exitus während der Nacht.

Inkubationsstadium: 5 Tage.

Sektion am 8. Nov. 10 h. a. m. Abmagerung; in den Augenkugeln und an der Nase eingetrocknetes, eitriges Sekret.

Die Cornea des linken Auges ist stark milchig getrübt und undurchsichtig. Bei seitlicher Betrachtung bemerkt man einen kleinen Defekt auf der Hornhaut; Conjunctivitis; Rhinitis.

Die serösen Höhlen sind frei von Exsudat. Die Darmschleimhaut ist glasig geschwollen, und unter dem zähen Schleim diffus gerötet; wenig Darminhalt; Leber und Milz sind normal.

In allen Lungenlappen kleinere und größere pneumonische Herde. Die Lungenspitzen sind in toto infiltriert.

Auf dem Herzen keine Petechien.

Herzblut flüssig.

II. Versuch.

Als Material benutzte ich, wie im vorhergehenden Versuch, Nasenausfluß von demselben Hund, den ich zur Gewinnung von Material infiziert hatte.

Zur Filtration diente ein Chamberlandfilter.

Als Impftiere benutzte ich diesmal 2 Katzen. Impfung des sterilen Filtrates am 4. Nov.

II. Versuchstier, Kater, ca. 12 Wochen alt. 2 ccm subkutan, 1 ccm per os, 1 ccm in die Nase, 1 ccm in die Augen.

Unterbringung: In demselben Raum wie Ia.

Verlauf der Impfung: Das Tier zeigte keine Krankheitserscheinungen als Folge der Impfung, und blieb gesund.

IIa. Kontrolltier, Katze, ca. 12 Wochen alt.

Unterbringung in einem staupfreien Kleinviehstall (II) des Institutes.

Verlauf der Impfung: Nach einem Inkubationsstadium von 21 Tagen (!) zeigten sich die ersten offensichtlichen Krankheitserscheinungen.

25. Nov. Appetit schlecht.

30. Nov. Starker Durchfall.

In den folgenden Tagen magert das Tier stark ab. Seröser Augenausfluß. Die Nachhand erscheint gelähmt.

7. Dez. Exitus.

Sektion am 7. Dez. 9 h. a. m. Starke Abmagerung; das Haarkleid ist schmutzig und struppig und in der Umgebung des Afters mit Kot beschmutzt.

Rhinitis, Conjunctivitis.

Rechte Lunge normal, in der linken Hypostase; im linken Unterlappen einige kleine, linsenkorngroße, pneumonische Herde.

Die Darmschleimhaut ist geschwollen, und im Verlauf des ganzen Darmtraktes stark diffus entzündet.

Leber und Milz sind normal.

III. Versuch.

Als Material benutzte ich die Lunge des am 8. Nov. verendeten Kontrollhundes Ia. Die Lunge wurde zerkleinert und durch den Wolf getrieben. Die erhaltene Masse wurde mit Kochsalzlösung versetzt und lange Zeit geschüttelt. Zur Befreiung von allen festen Bestandteilen diente eine Vorfiltration durch Watte und Fließpapier. Die so gereinigte Flüssigkeit war aber, wie ein Versuch zeigte, noch nicht fähig, ein Filter zu passieren; deshalb filtrierte ich die Flüssigkeit durch eine Kieselguraufschwemmung.

Darauf erfolgte die Filtration durch ein Chamberlandfilter.

Impfung am 13. Nov.

III. Versuchshund, männl. Bastard, ca. 10 Wochen alt. 4 ccm subkutan, 2 ccm in die Nase, 1 ccm in die Augen.

Unterbringung: In einer Holzkiste in einem staupfreien Kuhstall des Institutes.

Verlauf der Impfung: Das Tier blieb gesund.

IIIa. Kontrollhund, männl. Bastard, ca. 14 Wochen alt. Erhielt dieselben Dosen am 13. Nov.

Unterbringung: In einem eisernen Käfig im Kleinviehstall II.

Verlauf der Impfung:

Inkubationsstadium: 4 Tage.

17. Nov. Beginnende Sekretion der Augen- und Nasenschleimhaut.

19. Nov. Eitrige Sekretion; Durchfall.

23. Nov. Exitus.

Sektion am 23. Nov. 10 h. a. m. Starke Abmagerung; eingetrocknetes eitriges Sekret in den Augenwinkeln und an der Nase. In der Trachea schaumiger Schleim.

Beide Lungen mit größeren und kleineren Herden im Stadium der Infiltration durchsetzt. Der linke Mittellappen und Unterlappen sind in toto vereitert.

Die Darmschleimhaut ist glasig geschwollen und mit Hämorrhagieen durchsetzt. Die hinteren Darmabschnitte sind mit flüssigem Kot angefüllt, der von blutigen Streifen durchzogen ist.

IV. Versuch.

Zu diesem Versuch benutzte ich Nasenausfluß von staupekranken Hunden (aus der Poliklinik der tierärztlichen Hochschule). Zubereitung unter I und II beschrieben.

Filtration durch ein Chamberlandfilter.

Impfung am 21. Nov.

IV. Versuchshund, weibl. Bastard, ca. 18 Wochen alt. 4 ccm subkutan, 2 ccm in die Nase, 1 ccm in die Augen.

Unterbringung: In einer staupefreien Schweinebox (I).

Verlauf der Impfung: Das Tier war, solange es in diesem Raume blieb, gesund, also über die normale Inkubationsdauer hinaus. Äußerer Umstände halber wurde der Hund am 7. Dez., nach 17 Tagen, ohne mein Wissen in den Pferdestall I gebracht, wo Kontrollhund Ia gestorben war. Dort blieb er auch 4 Tage lang munter wie bisher. Am 5. Tage jedoch setzte die Krankheit ein. Das Tier verlor seine Munterkeit und seinen Appetit. Die Krankheit nahm ihren regelmäßigen Verlauf; es traten Durchfall, Erbrechen und Husten hinzu. Der in den ersten Tagen seröse Augenausfluß wurde bald eitrig.

17. Dez. Exitus in der Nacht.

Inkubationsstadium: 5 Tage.

Sektion am 17. Dez. 10 h. a. m. Eitrige Conjunctivitis und Rhinitis. Heftige Gastritis, leichtere Enteritis. Pleuritis; gelbklares Exsudat im Brustraum. Perikarditis, ziemlich viel klares Exsudat im Herzbeutel.

Lungenoberfläche an einer pfennigstückgroßen Stelle mit der Brustwand verwachsen.

Die Lunge ist mit Ausnahme des linken Oberlappens, der nur einige kleine Herde enthält, in toto pneumonisch infiltriert und stark mit Eiterherden durchsetzt. Auf dem Durchschnitt quellen Eiterpfropfe aus den Bronchien hervor. Hochgradige Bronchopneumonie.

Auch hier liegt wie bei Fall I die Ursache der Erkrankung deutlich zutage. Eine Infektion durch das Filtrat und seine Wirkung nach 21 Tagen ist kaum anzunehmen im Hinblick auf die nur 4-tägige Inkubationsdauer bei dem Kontrollhund No. IVb und die ebenfalls kurze Inkubationsdauer bei den übrigen Hunden. Vielmehr ist die Erkrankung allein auf den Wechsel des Aufenthaltsortes zurückzuführen.

IVa. Kontrollhund, männl. Bastard, ca. 14 Wochen alt.

Impfung am 21. Nov.; erhielt dieselben Dosen.

Unterbringung: In einem eisernen Käfig in einem Maschinenraum.

Verlauf der Impfung: Patient wurde am nächsten Morgen (22. Nov.) um 7 h. tot in seinem Käfig aufgefunden.

Sektion am 22. Nov. 10 h. a. m. Rhinitis, partielle katarrhalische Lungenentzündung, Enteritis.

Da ich bei der Sektion nicht genügend Anhaltspunkte für einen so raschen Tod fand, impfte ich, um jeden Zweifel zu beheben, einen neuen Hund zur Kontrolle mit derselben noch vorhandenen Kontrollflüssigkeit am 22. Nov.

IVb. Kontrollhund, männl. Bastard, ca. 14 Wochen alt. 3 ccm subkutan, 1 ccm in die Nase, 1 ccm in die Augen.

Unterbringung: In einer großen Holzkiste in einem staupefreien Pferdestall II.

Verlauf der Impfung: Bei diesem Hunde traten am 26. Nov. an den beiden Impfstellen hinter dem Schulterblatt Abszesse auf; das Allgemeinbefinden war schlecht. Die Abszesse wurden antiseptisch behandelt und heilten nach einer Woche ab. Das weitere Allgemeinbefinden war ein wechselndes. Nach dem Abheilen der Wunden schien eine Besserung einzutreten, die ca. 8 Tage anhielt. Dann aber traten am 12. Dez. die Krankheitserscheinungen wieder deutlich hervor. Es stellten sich Mattigkeit, Augen- und Nasenausfluß, Husten und Erbrechen ein. Diese Symptome führten unter steter Steigerung und Sinken der Temperatur unter die Norm am 23. Dez. zum Tode.

Sektion am 23. Dez. 10 h. a. m. Abmagerung, Conjunctivitis und Rhinitis purulenta, Gastritis, Enteritis besonders im Dünndarm. Katarthalische Pneumonie. Die Lungenspitzen in toto infiltriert, das übrige Lungenparenchym ist von einigen größeren und sehr vielen kleineren, stecknadelkopfgroßen pneumonischen Herden durchsetzt.

V. Versuch.

Material: Nasenausfluß wie bei Versuch IV.

Filtration durch Chamberlandkerze.

Impfung am 21. Nov.

V. Versuchshund, männlicher Bastard, ca. 12 Wochen alt. 5 ccm subkutan, 1 ccm in die Augen, 3 ccm in die Nase.

Unterbringung: In einem eisernen Käfig; durch ein Versehen des Wärters in dem Kleinviehstall II, wo Kontrolltier 2a untergebracht ist.

Verlauf der Impfung. Das Benehmen des Tieres war in den ersten Tagen ein wechselndes. Am 25. Nov. (Inkubationsdauer 4 Tage) traten die bekannten Krankheitserscheinungen auf, die unter schneller Steigerung am 27. Nov. zum Tode führten.

Sektion am 27. Nov. vormittags. Struppiges Haarkleid, Abmagerung, Keratitis, Conjunctivitis und Rhinitis sero-purulenta. Pneumonische Herde in allen Lungenlappen. Auf der Höhe der Magenfalten leichte Rötung. Darmschleimhaut geschwollen und diffus gerötet.

Va. Kontrollhund, männlicher Bastard, ca. 14 Wochen alt. Verimpfung derselben Dosen am 21. Nov.

Unterbringung: In einem eisernen Käfig in einem Maschinenraum.

Verlauf der Impfung. Nach einem Inkubationsstadium von 4 Tagen zeigt sich am

25. Nov. das bekannte Bild,

26. Nov. Husten und Durchfall,

28. Nov. Exitus 9 h. a. m.

Sektion am 28. Nov. 10 h. a. m. Conjunctivitis purulenta. In der Lunge viele kleine pneumonische Herde, die Lungenspitzen in toto infiltriert. Diffuse Darmentzündung.

VI. Versuch.

Material: Nasenausfluß staupekranker Hunde aus der Poliklinik.

Filtration durch Reichelkerze.

Impfung am 21. Nov.

VI. Versuchshund, weiblicher Bastard, ca. 14 Wochen alt. 4 ccm subkutan, 2 ccm in die Nase, 1 ccm in die Augen.

Auch dieser an demselben Tage wie der Versuchshund V geimpfte Hund wurde durch einen Irrtum des Wärters in einem Pferdestall, in dem am 26. Okt. ein Hund an nervöser Staupe eingegangen war, untergebracht.

Verlauf der Impfung:

Inkubationsstadium: 6 Tage.

27. Nov. seröser Augen- und Nasenausfluß.

28. Nov. verminderter Appetit, heiserer Husten.

In den nächsten Tagen stärkeres Hervortreten aller Symptome.

31. Nov. Temperatur 35,6°.

1. Dez. Exitus während der Nacht.

Sektion am 1. Dez. vormittags. Pusteln am Bauch, auf dem Rücken und an den Extremitäten.

Augen verklebt, Conjunctivitis purulenta, Keratitis. Beide Lungen in toto pneumonisch infiltriert; die Lungenspitzen sind vereitert.

Via. Kontrollhund, männlicher Bastard, ca. 4 Wochen alt.

Impfung am 21. Nov.

Unterbringung in einer Holzkiste im Pferdestall I.

Verlauf der Impfung: Nach 5-tägiger Inkubation Auftreten der Krankheit mit Augen- und Nasenausfluß und Durchfall. 28. Dez. Exitus 6 h. a. m.

Sektion am 28. Nov. 10 h. a. m. Abmagerung, Conjunctivitis und Rhinitis; in den Lungen viele große, pneumonische Herde im Stadium der Infiltration, einige in stadio suppurationis.

Darmschleimhaut glasig geschwollen und diffus gerötet. Blutiger Kotinhalt.

VII. Versuch.

Material: Die Lunge des verendeten Kontrollhundes IIIa wurde zerkleinert, durch den Wolf getrieben und mit Kochsalzlösung geschüttelt, dann zentrifugiert und durch Kieselgur vorfiltriert.

Die erhaltene Menge war so reichlich, daß ich sie auch zum VIII. und IX. Versuch benutzen konnte.

Filtration durch Chamberland.

Impfung am 28. Nov. nach 4-tägigem Aufenthalt im Brutschrank.

VII. Versuchshund, männlicher Bastard, ca. 14 Wochen alt. 4 ccm subkutan, 2 ccm in die Nase, 1 ccm in die Augen.

Unterbringung: In einer Holzkiste in einem staupefreien Bodenzimmer eines Institutsstalles.

Verlauf der Impfung: Das Tier blieb gesund.

VIIa. Kontrollhund, weiblicher Bastard, ca. 14 Wochen alt.

Impfung am 28. Nov. (Die Kontrollmenge noch etwas nach Fäulnis.)

Unterbringung: In einem eisernen Käfig im Kellergang.

Verlauf der Impfung: Patient war nach der Impfung matt und verweigerte die Futteraufnahme. In den nächsten Tagen besserte sich das Allgemeinbefinden scheinbar. Am 6. Dez. traten die ersten Krankheitserscheinungen auf. Das Krankheitsbild war das schon oft gesehene. Nach wechselndem Befinden am 17. Dez. Exitus.

Inkubationsstadium: 8 Tage.

Sektion am 17. Dez. vormittags. Conjunctivitis und Rhinitis purulenta; die linke Lunge in toto pneumonisch infiltriert bis auf einige Randpartieen, teilweise sogar in stadio suppurationis. Die rechte Lunge zeigt zahlreiche kleinere Herde im Stadium der Infiltration. Die Magenschleimhaut ist höher gerötet und entzündlich geschwollen; die Pylorus-

gehend ist hochrot gefärbt. Die Darmschleimhaut ist in großer Ausdehnung stark gerötet und geschwollen.

VIII. Versuch.

Material: s. Versuch VII.

Filtration durch Reichelkerze.

Impfung am 28. Nov.

VIII. Versuchshund, männlicher Bastard, ca. 14 Wochen alt. 3,5 ccm subkutan, 1 ccm in die Nase, 0,5 in die Augen.

Unterbringung: In einer Holzkiste in einem staupfreien Bodenzimmer.

Verlauf der Impfung: Das Tier blieb gesund.

VIIIa. Kontrollhund, männlicher Bastard, ca. 14 Wochen alt.

Impfung am 28. Nov.

Unterbringung: In einem eisernen Käfig im Kleinviehstall III.

Verlauf der Impfung:

Inkubationsdauer: 6 Tage.

4. Dez. typischer Ausfluß aus der Nase und aus den Augen.

8. Dez. Benehmen weniger munter.

11. Dez. Husten, Durchfall.

In den folgenden Tagen nimmt der Husten an Intensität zu, der Ausfluß aus der Nase wird eiterig; die Augen sind verklebt.

18. Dez. Das Tier ist völlig apathisch und nimmt keine Nahrung mehr zu sich.

20. Dez. Exitus.

Sektion am 20. Dez. 10 h. Eiterige Conjunctivitis, Cornea beider Augen milchig trübe. Enteritis (das gewöhnliche Bild).

Der Mittellappen der Lunge in toto pneumonisch infiltriert; im übrigen Lungenparenchym kleinere und größere Herde.

IX. Versuch.

Material: s. Versuch VII.

Impfung am 29. Dez.

Filtration durch Pukalfilter.

IX. Versuchshund, weiblicher Dalmatiner im Alter von 12 Wochen. 5 ccm subkutan, 2 ccm in die Nase, $\frac{1}{2}$ ccm in die Augen, 1 ccm per os.

Unterbringung: Schweinebox II.

Verlauf der Impfung: Das Tier blieb gesund.

IXa. Kontrollhund, weiblicher Bastard, ca $\frac{1}{2}$ Jahr alt.

Impfung am 29. Nov.

Unterbringung: In einem eisernen Käfig im Kleinviehstall III.

Inkubationsdauer: 8 Tage.

7. Dez. Augen- und Nasenausfluß.

11. Dez. Husten.

Wechselndes Befinden in den nächsten Tagen.

16. Dez. Erbrechen und Durchfall.

Da das Tier äußerst kräftig ist, bleibt der Zustand schwankend bis zum 24. Dez.

Dann tritt eine deutliche Verschlimmerung ein von seiten des Digestions- wie des Respirationsapparates.

Exitus am 27. Dez.

Sektion am 28. Dez. 10 h. a. m. Abmagerung, Conjunctivitis und Rhinitis purulenta. Hochgradige Gastritis und Enteritis. In der Lunge

viele große pneumonische Herde, der rechte Unterlappen gänzlich infiltriert und vereitert.

X. Versuch.

Material: Lunge des verstorbenen Versuchshundes No. VI.

Filtration durch Chamberlandkerze.

Impfung am 3. Dez.

X. Versuchshund, männlicher Bastard, ca. 14 Wochen alt. 5 ccm subkutan, 1 ccm in die Nase, 1 ccm in die Augen, 3 ccm per os.

Unterbringung: In einer Holzkiste in einem staupefreien Bodenzimmer eines Institutsstalles.

Verlauf der Impfung: Das Tier blieb gesund.

Xa. Kontrollhund, männlicher Bastard, ca. 12 Wochen alt.

Impfung am 3. Dez.

Unterbringung: In einem eisernen Käfig in dem Kleinviehstall I.

Verlauf der Impfung:

Inkubationszeit: 6 Tage.

9. Dez. Nasenausfluß, Husten.

12. Dez. eitriger Augen- und Nasenausfluß.

17. Dez. häufiges Erbrechen. Futteraufnahme verweigert, großer Durst.

21. Dez. Exitus.

Sektion am 21. Dez. Conjunctivitis und Rhinitis purulenta, Gastro-Enteritis, die serösen Höhlen sind frei von Exsudaten. Lunge in toto mit Ausnahme der Randpartieen eitrig infiltriert. Leber stark steatotisch. Milz blaß.

Anliegende Tabelle gestattet einen kurzen Ueberblick über meine Versuche und enthält übersichtliche Angaben über die Filtersorten, die Quantität des Impfstoffes, die Inkubationsdauer, den Ausgang der Impfungen, und einen kurzen Sektionsbericht bei den einzelnen Versuchen.

Zum Nachweis, daß bei den gesund gebliebenen Hunden das Ausbleiben einer Erkrankung nach der Impfung nicht etwa die Folge von natürlicher Immunität der betreffenden Tiere war, impfte ich sämtliche gesund gebliebenen Hunde mit virulentem Material, das ich aus der stark pneumonisch infiltrierten Lunge eines verendeten Kontrollhundes herstellte. Da ich ziemlich große Mengen injizierte (4 ccm subkutan, 3 ccm in die Nase, 5 ccm per os), erkrankten alle Tiere sehr schnell und erlagen nach wenigen Tagen (4—10 Tagen) der Krankheit. Der Sektionsbefund war bei allen fast übereinstimmend mit dem der verendeten Kontrollhunde, z. B. No. VIIa.

Conjunctivitis und Rhinitis purulenta, hochgradige Gastro-Enteritis und ausgedehnte pneumonische, zum Teil vereiterte Herde in allen Lungenlappen. Pusteln und Perikardialflüssigkeit fehlten.

Da bei allen Hunden der Sektionsbefund ein typischer war, ist damit der Beweis erbracht, daß, obwohl die Tiere für die Staupe empfänglich waren, durch die Injektion des Filtrates doch keine Erkrankung eintrat, mithin das Filtrat nicht virulent sein konnte. Außerdem ist durch das Filtrat eine erworbene aktive oder passive Immunität nicht eingetreten.

Was die beiden Versuche V und VI anbelangt, bei denen die Versuchshunde erkrankten, so halte ich es für sicher, daß nicht das Filtrat die Krankheit hervorgerufen hat, sondern der Aufenthalt in einem versuchten Raum, in dem diese beiden Hunde irrtümlicherweise untergebracht worden waren. In dieser Ansicht bestärkt mich das Gesamt-

Nummer des Versuches	Filtrat oder Kontrolle	Art der Filter	Tag der Impfung	Quantum des Impfstoffes	Unterbringung
I	Filtrat	Reichel	28. Okt.	2 ccm	Kleinviehstall I
I a	Kontrolle		28. Okt.	2 ccm	Pferdestall I
II	Filtrat	Chamberland	4. Nov.	5 ccm	Kleinviehstall I
II a	Kontrolle		4. Nov.	5 ccm	Kleinviehstall II
III	Filtrat	Chamberland	13. Nov.	7 ccm	Kuhstall
III a	Kontrolle		13. Nov.	7 ccm	Kleinviehstall II
IV	Filtrat	Chamberland	21. Nov.	7 ccm	Schweinebox I
IV a	Kontrolle		21. Nov.	7 ccm	Maschinenraum
IV b	Kontrolle		22. Nov.	5 ccm	Pferdestall II
V	Filtrat	Chamberland	21. Nov.	9 ccm	Kleinviehstall II
V a	Kontrolle		21. Nov.	9 ccm	Maschinenraum
VI	Filtrat	Reichel	21. Nov.	7 ccm	verseuchter Pferde- stall
VI a	Kontrolle		21. Nov.	7 ccm	Pferdestall I
VII	Filtrat	Chamberland	28. Nov.	7 ccm	Bodenzimmer
VII a	Kontrolle		28. Nov.	7 ccm	Instituts Keller
VIII	Filtrat	Reichel	28. Nov.	5 ccm	Bodenzimmer
VIII a	Kontrolle		28. Nov.	5 ccm	Kleinviehstall III
IX	Filtrat	Pukal	29. Nov.	8,5 ccm	Schweinebox II
IX a	Kontrolle		29. Nov.	8,5 ccm	Kleinviehstall III
X	Filtrat	Chamberland	3. Dez.	10 ccm	Bodenzimmer
X a	Kontrolle		3. Dez.	10 ccm	Kleinviehstall II

Erkrankt am	Inkubations- stadium	Ausgang	Sektionsbefund	Bemerkungen
—	—	gesund		Blieb 36 Tage gesund. Seine Erkrankung nach Kohabitation mit X a dient als Kontrolle
3. Nov.	5 Tage	gest. 8. Nov.	Conjunctivitis, Keratitis, Rhi- nitis, Enteritis und Pneu- monie	
—	—	gesund		Nach der Kontroll- impfung gestorben
25. Nov.	21 Tage	gest. 7. Dez.	Rhinitis, Enteritis, Pneu- monie	
—	—	gesund		Nach der Kontroll- impfung gestorben
17. Nov.	4 Tage	gest. 23. Nov.	Conjunct., Rhinitis, Enteritis, Pneumonie	
—	—	gesund	Conjunct., Rhinitis, Gastro- Enteritis, Pleuritis, Peri- carditis, Pneumonie	Erkrankte n. 22 Tg. infolge Wechsel des Stalles
—	—	gest. 22. Nov.	Rhinitis, Enteritis, Pneu- monie	
26. Nov.	4 Tage	gest. 23. Dez.	Conjunct., Rhinitis, Gastro- Enteritis, Pneumonie	
25. Nov.	4 Tage	gest. 27. Nov.	Conjunct., Rhinitis, Enteritis, Pneumonie	Irrtümlich falsche Unterbringung
25. Nov.	4 Tage	gest. 28. Nov.	Derselbe Befund	
27. Nov.	6 Tage	gest. 1. Dez.	Pusteln, Conjunct., Keratitis, Pneumonie	Irrtümlich falsche Unterbringung
26. Nov.	5 Tage	gest. 28. Nov.	Conjunct., Rhinitis, Enteritis, Pneumonie	
—	—	gesund		Nach der Kontroll- impfung gestorben
6. Dez.	8 Tage	gest. 17. Dez.	Conjunct., Rhinitis, Enteritis, Pneumonie	
—	—	gesund		Nach der Kontroll- impfung gestorben
4. Dez.	6 Tage	gest. 20. Dez.	Conjunct., Keratitis, Enteritis, Pneumonie	
—	—	gesund		Nach der Kontroll- impfung gestorben
7. Dez.	8 Tage	gest. 27. Dez.	Conjunct., Rhinitis, Enteritis, Pneumonie	
—	—	gesund		Nach der Kontroll- impfung gestorben
9. Dez.	6 Tage	21. Dez.	Conjunct., Rhinitis, Gastro- Enteritis, Pneumonie	

resultat, daß zwei andere Versuche mit Reichel-Filtern und fünf mit Chamberland-Filtern entgegengesetzt ausfielen.

Bei der überaus großen Ansteckungsfähigkeit der Staupe sind derartige Versuche mit den größten Schwierigkeiten verknüpft, weil in kurzer Zeit alle zur Verfügung stehenden Räumlichkeiten verseucht sind und dadurch ein Fortführen der Versuche unmöglich wird.

Infolge der Ergebnisse meiner nicht sehr zahlreichen Versuche bin ich nicht in der Lage, die Angaben von Carré bestätigen zu können.

Seine Behauptung, daß der eitrige Nasenausfluß im Gegensatz zu dem serösen nicht mehr virulent sei, habe ich nicht bestätigt gefunden, da die Kontrolltiere derjenigen Versuche, bei denen eitriger Nasenausfluß als Material diente, prompt auf die Injektion reagierten.

Ferner habe ich das Symptom, das Carré als das spezifische für seinen Filtermikroben erklärt, Myocarditis und perikarditischer Erguß, nur einmal feststellen können, und in diesem Falle war die Pericarditis mit einer Pleuritis verbunden und das Exsudat im Herzbeutel keineswegs gering, sondern ziemlich copiös (vergl. Versuch IV).

Ebenso habe ich die für Carré so wichtigen Pusteln nur einmal gefunden (vergl. Versuch VI).

Bezüglich der Filtrierbarkeit des Kontagiums setzen mich meine Versuche nicht in die Lage, mich der Ansicht von Carré anschließen zu können, vielmehr bin ich der Ueberzeugung, daß der Infektionserreger der Hundestaupe nicht unter den filtrierbaren, sondern unter den zahlreichen, schon beschriebenen, visiblen Erregern zu suchen ist.

Zum Schluß möchte ich nicht verfehlen, Herrn Geh. Med.-Rat Prof. Dr. Frosch auch an dieser Stelle meinen verbindlichsten Dank auszusprechen für die mannigfachen Anregungen und die wohlwollende Teilnahme am Fortgang meiner Arbeit. Ferner danke ich Herrn Prof. Regenbogen für die freundliche Ueberlassung des Materials, sowie dem wissenschaftlichen Hilfsarbeiter im Institut, Herrn Dr. Rich. Broll, für seine lebenswürdige Unterstützung.

Literatur.

- 1) Carré, Sur „la maladie des chiens“. (Bull. de la soc. de méd. vét. 1905. p. 148—150.)
- 2) — —, Sur „la maladie des chiens“. (ibid. p. 335—339.)
- 3) — —, Sur „la maladie des chiens“. (Recueil de méd. vét. 1906. p. 389—391.)
- 4) Lignières, Sur „la maladie des chiens“ et le microbe filtrant de Carré. (Bull. de la soc. de méd. vét. 1906. p. 622—631. — Zit. nach Richter [l. c.])
- 5) Richter, Die Hundestaupe, ihre Vorbeugung und Behandlung durch Impfung. Dessau 1908.
- 6) v. Wunschheim, Ein Beitrag zur Aetiologie der Hundestaupe. München 1905. (Arch. f. Hyg. Bd. LIII. p. 1—47.)
- 7) Friedberger-Fröhner, Lehrb. d. spez. Pathol. u. Therapie. 6. Aufl. Stuttgart 1904.
- 8) Galli-Valerio, Der gegenwärtige Stand unserer Kenntnisse von der Aetiologie der Hundestaupe. (Centralbl. f. Bakt. etc. Abt. I. Orig. Bd. XLI. No. 17—18.)
- 9) Rosenthal, Werner, Untersuchungen über die Filtration von Hühnerpestvirus und von feinsten Bakterien und über die Eigenschaften poröser Filter. (Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. Bd. LX. 1908. Heft 2.)

Nachdruck verboten.

Einige Beobachtungen an *Spirochaete recurrentis* (Obermeieri).

**Bemerkungen zu der Arbeit von Dr. Richard Gonder:
„Die Stellung der Spirochäten unter den Protisten“ in
Bd. XLIX. Heft 2 des Centralbl. f. Bakt. etc.**

[Aus dem Laboratorium der medizinischen Klinik zu Leipzig
(Direktor: Geheimer Rat Prof. Dr. Curschmann).]

Von Dr. P. A. Hoefler.

Mit 5 Figuren.

Die Arbeit von Gonder: „Die Stellung der Spirochäten unter den Protisten“ in Bd. XLIX. Heft 2 des Centralbl. f. Bakt. etc., die mir leider bisher entgangen war, veranlaßt mich, einige Beobachtungen über Kernstrukturen und Längsteilungsformen bei *Spirochaete recurrentis* (Obermeieri) mitzuteilen, die ich eigentlich erst im Zusammenhange mit einigen anderen Untersuchungen über *Recurrens* veröffentlichen wollte.

Für die Untersuchung standen mir Ausstriche von menschlichem Blute zur Verfügung, die ich der lebenswürdigen Vermittelung von Frau Dr. Belkin verdanke. Die Präparate wurden vorwiegend nach Giemsa's Methode gefärbt.

Ueber die Frage, ob die Vermehrung der Spirochäten durch eine Längs- oder eine Querteilung erfolgt, gehen bekanntlich die Meinungen der einzelnen Forscher noch weit auseinander, und dementsprechend werden die Spirochäten teils den Protozoen, teils als sich querteilende „Spirillen“ den Bakterien zugerechnet. Dies gilt speziell auch für die *Recurrensspirochäten*, für die Koch, Novy und Knapp, Zettnow, Levaditi, Schellak u. a. eine Querteilung angeben. Zugleich betonen freilich einige Autoren (Zettnow, Schellak u. a.), daß es sich hier um eine ganz spezifische Art der Querteilung, nämlich ohne Ausbildung einer Scheidewand, handele, die bei Bakterien nicht vorkomme. Andererseits weisen andere Autoren (vgl. Sobornheim, in dem von ihm bearbeiteten Kapitel über die Spirochäten in Kolle-Wassermann's Handbuch) darauf hin, daß eine Längsteilung auch bei Bakterien gefunden werde. Für den Erreger des westafrikanischen Rückfallfiebers, *Spirochaete Duttoni*, hat Markham Carter eine Längsteilung angenommen.

Gegen das Vorkommen einer Längsteilung wird angeführt, daß sogenannte Y-Formen nur sehr selten angetroffen werden, daß man sie nicht von einer einfachen Aneinanderlagerung zweier Spirochäten unterscheiden könne; und daß man dagegen weit häufiger Spirochäten fände, die in der Mitte eine verschieden starke und verschieden lang ausgezogene Verdünnung ihres Zelleibes zeigen — was als Vorstadium einer Querteilung aufgefaßt wird. Diese letzteren Formen sind nun andererseits wieder so gedeutet worden, daß es sich um die im Endstadium einer Längsteilung auseinandergeklappten zwei neu entstandenen Individuen handele. Gegen diese Deutung wendet Schellak (Arb. a. d. Kaiserl. Gesundheitsamte. Bd. XXVII) ein, daß, wie es bei Annahme einer Querteilung zu erwarten sei, die durch den verdünnten Faden

verbundenen Spirochäten eine' geringere Anzahl von Windungen aufwiesen als die unveränderten typischen Spirochäten. Dies trifft allerdings wohl meist zu, doch habe ich daneben auch einzelne Formen gesehen, deren Teilstücke genau so groß waren wie die übrigen Spirochäten. Als Beweis gegen eine Längsteilung führt Schellak nun an, daß er in — nach Zettnow versilberten — Präparaten von Spirochäten, die vorher stark ausgewaschen und zentrifugiert waren, nur selten Längsteilungen gefunden habe. Dies erklärt er so, daß auf diese Weise aneinandergelagerte Individuen getrennt worden seien. Dieser Befund läßt sich vielleicht aber auch so deuten, daß gerade das Verfahren des starken Auswaschens und Zentrifugierens dazu führt, die im Endstadium einer Längsteilung eben noch gerade zusammenhängenden Spirochäten zu trennen, während bei den durch ein, wenn auch verdünntes, Verbindungsstück zusammenhängenden Formen die Kontinuität weniger leicht zu trennen ist.

Daß einige dieser Formen mit verdünntem mittleren Verbindungsstück durch das Auseinanderklappen von zwei aus einer Längsteilung hervorgegangenen Teilspirochäten entstanden sind, ist nicht unmöglich, z. B. diejenigen, deren „Teilspirochäten“ einen spitzen oder stumpfen Winkel einschließen, oder solche, die in der Mitte leicht abgeknickt erscheinen. Auf die Mehrzahl dieser Formen läßt sich diese Erklärung aber wohl nicht anwenden.

Nun wird man ja selbstverständlich erst dann von einem sicheren Beweise für Längs- bzw. Querteilung reden können, wenn es gelungen ist, eine solche Teilung unter dem Mikroskope sich vollziehen zu sehen; aber man findet doch auch im gefärbten Ausstrichpräparate Bilder, die beweiskräftig für einen bestimmten Teilungsmodus erscheinen.

So glaube ich aus gewissen Befunden auf das Vorkommen einer Längsteilung bei *Spirochaete recurrentis* (Obermeieri) schließen zu dürfen. Ich fand bei der Durchmusterung einer großen Anzahl von Präparaten gar nicht so selten Längsteilungsformen, bei denen man mit großer Sicherheit ausschließen konnte, daß es sich um ein einfaches Aneinanderlagern zweier Spirochäten handelte, und die sich am ungezwungensten als durch Längsteilung entstanden erklären ließen. Man sieht Formen, bei denen die beiden Teilfäden einander völlig parallel laufen, so daß die eine Teilspirochäte die andere Stück für Stück bis in die tiefsten Windungen hinein begleitet, während die beiden Spirochäten an dem einen Ende noch fest miteinander verbunden sind (Fig. 1). Man kann dann auch leicht erkennen, daß der Dickendurchmesser der schon auseinandergelösten Enden entsprechend geringer ist, als der des noch ungeteilt gebliebenen Stückes. Letzteres erscheint im Verhältnis zu den gewöhnlichen Spirochäten meist leicht verdickt, während die Teilfäden sich durch eine besondere Zartheit und Feinheit auszeichnen. Auch konnte ich Spirochäten beobachten, bei denen in der einen Hälfte ihres Leibes, nahe dem einen Ende, eine Längsteilung begonnen hatte, während an den beiden Enden selbst noch keine Teilung eingetreten war. In Fig. 2 bilde ich einen solchen Befund ab bei einer zusammengerollten und verschlungenen Spirochäte (Depressionszustand).

Es scheint also, daß der Teilungsprozeß nicht immer gerade am äußersten Ende einsetzt, sondern auch an einer anderen Stelle des Spirochätenleibes beginnen kann.

Als zufällige Aneinanderlagerung von zwei Spirochäten lassen sich diese Befunde nicht auffassen. Ich glaube also für die *Spirochaete*

recurrentis Obermeieri eine Längsteilung annehmen zu dürfen. Daß daneben noch eine Querteilung vorkommt, ebenso häufig oder vielleicht noch häufiger als die Längsteilung, ist nicht unmöglich. Das Eintreten des einen oder anderen Teilungsmodus könnte ja auch durch bestimmte Verhältnisse des Längen- bzw. Dickenwachstums mitbestimmt werden. Aber für die Annahme, daß der eine oder andere Teilungsmodus bei Spirochäten zur Bildung geschlechtlicher Formen führe (Hartmann), fehlen zurzeit wohl noch die tatsächlichen Unterlagen.

Innenstrukturen sind bei der *Spirochaete recurrentis* Obermeieri auch bei gut gelungenen Färbungen nicht immer nachweisbar. Am häufigsten sieht man noch unregelmäßig verteilte und ungleich große Körnchen, wie sie öfter beschrieben worden sind, die sich durch intensivere Färbung von der Umgebung abheben. Bisweilen sieht man auch eine stärkere Anhäufung der chromatischen Substanz zu einem größeren Körnchen in der Mitte oder an beiden Enden der Spirochäte.

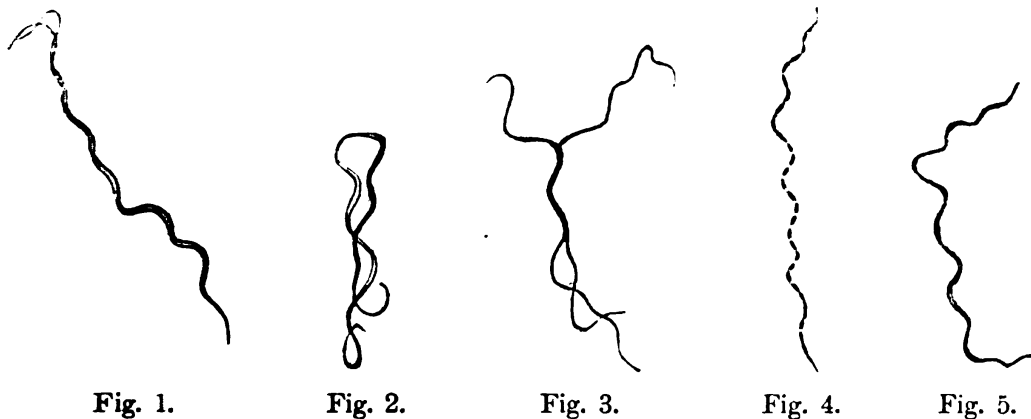


Fig. 1. Längsteilungsstadium.

Fig. 2. Längsteilungsstadium bei einer eigenartig verschlungenen Spirochäte.

Fig. 3. Sogenannte „Konjugation“ (Aneinanderlagerung bzw. Verwicklung?) zweier Spirochäten.

Fig. 4. Kernstrukturen („Schächtelchenbildung“).

Fig. 5. Kernstrukturen.

An diesen Stellen kann dann auch der Dickendurchmesser der Spirochäten vergrößert sein. Ebenso sah ich eine Anordnung der chromatischen Substanz zu regelmäßiger verteilten Körnchen, die sich an Größe nicht sehr unterschieden, und zwischen denen entsprechend große hellere Lücken bestanden: „Schächtelchenbildung“. Diese Bilder ähneln den von Gonder abgebildeten Formen von *Spirochaete pinnae* (l. c. Fig. 10 u. a.) (Fig. 4).

Besondere Beziehungen zwischen Teilungsvorgängen und bestimmter Anordnung des Chromatins, wie sie Gonder für *Spirochaete pinnae* und die Spirochäte aus dem Blute von *Vesperugo* (Arb. a. d. Kaiserl. Gesundheitsamte. Bd. XXVII) darstellen konnte, habe ich bei *Spirochaete recurrentis* Obermeieri nicht beobachten können.

Bezüglich der Entstehung von Plasmakügelchen schließe ich mich der Meinung von Gonder und Schellak an, die sie auf Verletzungen des Periplastes zurückführen. Bisweilen findet man auch eine den Spirochäten anliegende, mehr längliche, spindelförmige Plasmaanhäufung.

Hiervon sind die oben erwähnten leichten Anschwellungen des Zellleibes bei der Bildung größerer Chromatinkörner zu unterscheiden.

Innige Verschmelzung zweier Spirochäten, wie sie von v. Prowazek und Gonder als Konjugationsformen beschrieben werden, kann man auch bei *Spirochaete recurrentis* Obermeieri finden. Gonder (Arb. a. d. Kaiserl. Gesundheitsamte. Bd. XXVII) fand bei der Spirochäte aus *Vesperugo* in einem solchen Falle eine besondere Chromatinanordnung; doch läßt er hier die Möglichkeit zu, daß es sich um ein aus einer Teilung hervorgegangenes „Doppeltier“ handelte. In Fig. 3 bilde ich eine ähnliche Form von *Spirochaete recurrentis* Obermeieri ab, bei der es sich, wie ich aus der ungleichen Größe und unsymmetrischen Lagerung schließen zu dürfen glaube, nicht um eine Längsteilung handelt. Ob es sich hier nun aber wirklich um einen besonderen biologischen Vorgang (Konjugation) handelt und nicht nur eine zufällige Aneinanderlagerung bezw. Verwicklung besteht, muß ich unentschieden lassen.

Für verschiedene Spirochäten sind (von Schaudinn, v. Prowazek, Markham Carter, Perrin u. a.) sonderbare Verknotungen und Zusammenrollungen beschrieben und mit der Bildung von Ruheformen in Verbindung gebracht worden. Ebenso hat Gonder für *Spirochaete pinnae* eine vollständige Encystierung nachgewiesen. Aehnliche Verwickelungen und Aufrollungen finden sich auch bei *Spirochaete recurrentis* Obermeieri, doch möchte ich, so lange mir nicht deutlichere Bilder, besonders auch an lebendem Material vorliegen, meine Befunde ebenso wie Schellak für Depressionsformen oder auch für zufällige Zusammenrollungen ansehen.

Ich hoffe, auf diese Fragen später zurückkommen zu können.

Nachdruck verboten.

Studies in avian coccidiosis.

I. White diarrhea of chicks. II. Roup of fowls.

[From the Division of Biology, Rhode Island Agricultural Experiment Station, Kingston, R. I., U. A. S.]

By Philip B. Hadley.

I. White diarrhea of chicks.

White diarrhea of chicks is a disease affecting the duodenum, small intestines, large intestines, ceca, liver, pancreas, kidneys, spleen, and lungs, manifesting itself by inflammation and eventual necrosis of the epithelial, mucosal, and sub-mucosal tissues, and terminating fatally in the majority of cases, primarily as the result of mechanical damage to the linings of the alimentary tract, with consequent suspended constructive metabolism, and secondarily as a result of bacterial invasion of the tissues.

The etiology of the disease has been studied for many years. References to the occurrence of coccidia in enteritis of chicks manifesting the symptoms of white diarrhea have been reported by Salmon (1899), Eckhardt (1903), Morse (1908), and others. Some writers have sought to establish bacteria as the cause of the disease, as the case of

Rettger (1908) who assumes the organism to be *Bact. septicaemiae gallinarum*. The present paper is presented with the purpose of showing the relation of *Coccidium cuniculi* to white diarrhea, as this disease was studied in epidemics occurring in the poultry department of the Rhode Island Agricultural Experiment Station.

The macroscopical pathological appearances in white diarrhea observed in four hundred and twenty-seven autopsies were found to include the following features: 1) Occasional slight inflammation of the esophagus and proventriculus with congestion of the blood vessels. 2) Inflammation and thickening of the walls of the duodenum and small intestines, with congestion of the blood vessels; frequent small internal hemorrhage in both. 3) Distention and thickening of the walls of the large intestines and of the cloaca, which was usually filled with excrement mixed with mucous and urate crystals. 4) Ceca sometimes normal, but usually inflamed, and with thickened walls, often containing hard or soft yellowish exudate or "core", from which the walls of the ceca readily peeled away; this core might be present in one cecum or in both ceca; occasional hemorrhage between wall and core. 5) Liver normal in all early cases, but after thirteenth day of epidemic frequently flecked or spotted with white necrotic areas, either discrete or confluent; duodenum frequently affected without liver affection, but the reverse condition was less often observed. Out of 427 cases the duodenum alone was affected in 98, the liver alone in 22, and both in 46. 6) Pancreas usually normal but in 11 cases greatly enlarged, and having a hard cheesy texture. In all cases in which the pancreas was affected the duodenum was also. 7) Spleen enlarged in 8 cases. 8) Lungs were congested and contained grayish, resistant nodules in 78 cases. 9) Heart usually normal, but the surface often contained lobular enlargements of a somewhat hard gelatinous consistency; frequently hypertrophied. 10) Kidneys and ovaries enlarged in a few cases. Ureters always packed with urates. 11) In earlier cases the yolk sac was frequently not properly absorbed; yolk stock often inflamed, walls thickened and contained, in a few cases, a core similar to that found in the ceca.

The diseased tissues above mentioned were examined by means of fresh preparations, smears, and sections, the smears being stained with rose aniline violet and methylene blue, while the sections were stained with hematoxylin and eosin. By these methods the following pathological conditions were revealed: 1) The epithelium lining the duodenum, small intestines, large intestine and ceca was usually denuded to a greater or less extent. 2) In and among the epithelial and mucous cells were many coccidia in the schizont or macrogamete stage. The thickening of the walls of ceca or intestines was apparently due both to the number of parasites, and to the proliferation of small, granular cells. 3) The necrotic areas of the liver contained coccidia both in and out of the large liver cells. Where the coccidia were present in greatest numbers, the normal liver tissue was largely broken down and the parasites lay free in the connective tissue matrix. 4) The nodules from the lungs revealed, upon section, areas of marked congestion and occasional necrosis. The capillaries were gorged with blood cells, and small hemorrhages were common; the pulmonary alveoli were surrounded by numerous proliferated granular cells. The epithelium of the smallest branches of the bronchi and infundibula was often broken down, and in both cubical and ciliated cells were found inclusions which possessed the appearance of coccidia.

The parasitic bodies described above were, for the most part, the schizont stage of *Coccidium cuniculi*, which is also the causative agent of "blackhead" of turkeys, and of at least some of the cases of so-called "roup". The schizont stage of this organism is probably identical with the *Amoeba meleagridis* described by Smith (1895) as the causative agent of "blackhead" in turkeys. In the present epidemic other stages of the coccidium were also found, especially the merozoites and the macrogametes. No cysts were found in chicks under one month old. It is thus indicated that the original infection initiated, presumably, as a result of the ingestion of the permanent cysts, passes at once into the schizogonous or endogenous cycle of development; and that this cycle is maintained for some time before the sporogonous or exogenous cycle appears. If the young chicks can survive until the sexual elements (macrogametes and microgametes) are produced, then the cells are emptied of their contents, the crisis is passed, and there is hope of recovery; otherwise death supervenes before the crisis is reached. Chicks from one to two months old, which might or might not show symptoms of white diarrhea, almost invariably contained the permanent cysts in the cecal or intestinal content or both. Thus it may be said that the epidemic form of coccidiosis as represented by white diarrhea is supported entirely by the endogenous cycle of the organism, while the exogenous cycle plays no part in transmitting the infection until a much later date, when the disease still exists in semi-chronic form in many of the birds which survive.

Experiments in transmitting the disease by feeding the schizogonous stage of the coccidium, while not completed, indicate that the disease may be perpetuated in a flock without infection by means of the permanent cyst stage of the coccidium.

Bacteriological examination of the heart or liver of seventy-one chicks gave positive results in forty-four. The organism recovered in the majority of cases, was not, however, identical with the *Bact. septicaemiae gallinarum* of Rettger. Inoculation of this organism appeared to cause the death of several young chicks three weeks old, which were already suffering with coccidiosis, but failed to cause the death of any five-week-old chicks which survived the epidemic.

In conclusion it should be said that, in reality, white diarrhea is not a disease, but a symptom. It is merely the result of a deranged metabolism which may be caused by several factors working together or separately. One of these is coccidiosis; another may be the septicemia of Rettger, but it is probable that the disease of "white diarrhea" as it is known to most poultrymen, is primarily a form of coccidiosis.

II. Roup in fowls.

Roup is a communicable disease of fowls, and other domestic birds, usually of adults; manifesting itself in inflammation of, and exudate from, the mucous membranes of the orbital sinus, naso-lachrymal duct, nasal chamber, mouth, pharynx, larynx, (sometimes) esophagus, intestines, and ceca; and terminating fatally in the majority of cases as the result of a series of combined factors, including probably the toxic action of micro-organisms growing on the mucous membranes, mechanical obstruction to swallowing and to respiration, and a progressive marasmus frequently determined by intestinal complications.

The cause of roup has been sought for many years. Many different organisms have been isolated and reported as the specific cause of this disease. The list of causative organisms now includes several varieties of bacteria, cocci, "protozoan bodies", flagellates, and a filterable virus, not to mention the causes reported by many poultrymen. One author has suggested the agency of *Coccidia*, but this view has not been substantiated nor generally accepted.

During the present autumn and winter the writer has had the opportunity to examine six birds, all adult fowls, which died in the poultry department of the Rhode Island Agricultural Experiment Station, with the symptoms of roup. The following details are taken from records of the post mortem examination of these birds.

The onset of the disease was like simple catarrh, with watery exudate from the nose and eyes. Later the secretions became thicker and eventually ceased. The orbital sinus began to accumulate a thick mucous-like or soft, cheesy mass, which gradually hardened, packing the entrance to the naso-lachrymal canal and filling the orbital sinus. This condition was present in one or both eyes, which bulged from the side of the head like pop-eye in fishes. In some cases the pupil was forced out of the socket by the mass of yellowish cheesy exudate, which was formed at the sides and in back of the sinus; in other cases the exudate was in front and crowded the eyeball backward.

The naso-lachrymal canals were always affected. In three out of the six cases examined, only one eye contained exudate, but in all these cases the naso-lachrymal canal on the opposite side was also inflamed and filled with mucous. Infection of the other eye would probably have soon resulted. In all cases in which both eyes were affected, both canals were, also.

The nasal chambers and the palatine space were, in all cases, filled either with thick mucous or with cheesy exudate. The walls of the mouth cavity, of the pharynx and the margins of the glottis were whitened and necrotic while the walls of the anterior part of the esophagus as well as of the posterior pharynx were in most instances, punctated with small, firm, yellowish-white nodules from 1 to 2 mm in diameter. In one case these nodules attained a size of 12 mm, rising from $\frac{1}{2}$ to 3 mm from the surrounding tissue. These nodules extended into the esophagus and continued to the crop, in which they were present upon the dorsal surface, and sometimes extended further into the mouth of the proventriculus. The crop usually contained a small amount of food and the blood vessels were slightly congested. From the crop to the proventriculus the tract was usually inflamed, while the blood vessels of the proventriculus and gizzard were more strongly congested. The small intestines were inflamed in varying degrees, the walls considerably thickened and containing chiefly mucous mixed with blood. The duodenum was especially enlarged and inflamed. The large intestines were usually normal. In one case the walls were slightly thickened. The ceca as a whole were affected in but two cases, and here slightly. In one instance there was slight inflammation at the neck of the ceca, and in another case the thickening of the cecal wall was at the tip. In two instances the liver was affected, once slightly, once severely. In these cases the bile ducts were also inflamed and thickened. The lungs, heart, spleen, and reproductive organs were normal in all cases. The ureters usually contained urates which also filled the cloaca. The kidneys were usually normal, but in one bird were greatly enlarged.

The pathological condition of the tissues of the birds mentioned above was studied by means of fresh preparations, smears, and sections. The first were examined in normal saline solution. The smears were stained with rose aniline violet and methylene blue; the sections were cut 10 μ in paraffine and stained with haematoxylin and eosin.

Examination of the hard exudate from the orbital sinus by means of the smear method revealed nothing that could be identified as protozoan parasites. It was composed chiefly of mucous, coagulated serum, and greatly disintegrated cell substance. Attached to the borders of this hard exudate were strings of mucous. When those were smeared and stained by the rose-aniline-violet method, the presence of immense numbers of denuded epithelial and mucous cells together with many crimson bodies which had been found in earlier investigations in blackhead to be presumptive evidence of the presence of the schizont stage of *Coccidium cuniculi*. Examinations of fresh unstained preparations of thickened mucous from the orbital sinus and naso-lachrymal canal, revealed the same denuded cells, many of them greatly distended with the *Coccidia*, chiefly in the schizont stage, although macrogametes in the later stages of development were also observed. Loose schizonts were also found in great numbers. It appears probable that these bodies are identical with those which Harrison and Streit (1903) have mentioned as "swollen nuclei", usually found in connection with cases of roup. It may be noted in passing, however, that these writers isolated an organism, *Bacillus cacosmus*, which they believed stood in some causal relation to roup.

These bodies, the schizont or macrogamete stage of *Coccidium cuniculi*, were also demonstrated in great numbers in the mucous from the nasal chamber, palatine space, walls of mouth; also in scrapings from the walls of the pharynx, anterior and posterior esophagus, dorsal wall of gizzard, proventriculus, duodenum, bile duct, small intestines, neck of ceca, large intestines, contents of the cloaca, and in the excrement of the diseased birds. The encysted stage of the coccidium was found in four instances, once in great numbers in the duodenum, but usually in the intestines or ceca. These cysts were identical with those found in blackhead and white diarrhea. The evidence gained from sectioned material of portions of the alimentary tract supported the view that the pathological conditions represented a typical coccidiosis, and corresponded in every way with the pictures obtained from the sectioned material in blackhead and white diarrhea.

In the cases reported above no bacteriological examinations were made. It was apparent, however, that the factor of coccidiosis of the mucous membranes was, in all cases examined, sufficient to produce, without the assistance of bacteria, nearly all the pathological conditions observed. Just as blackhead, so-called, is a coccidiosis of the ceca and liver of turkeys, and as white diarrhea is a coccidiosis of the ceca, small intestines, and duodenum of young chicks, so the writer believes that many, and perhaps all, cases of the disease popularly called "roup", are instances of coccidiosis of the mucous membranes of the head region with or without intestinal complications. Further investigations of this subject are now in progress at the Rhode Island Agricultural Experiment Station.

In a second epidemic of white diarrhea occurring since the above notes were written, results similar to those in the first epidemic were

obtained. In the latter epidemic the lungs of 130 chicks from 318 which died, were examined bacteriologically. Of these 130 cultures, 27 were negative. Of the remaining 103, 63 showed the Bact. septicemia gallinarum of Rettger either in pure culture or mixed with other organisms. Of the 63 examinations showing Rettger's bacterium 46 also showed coccidiosis; of the 40 not showing Rettger's bacterium, 22 showed coccidiosis. Of the 27 bacteriological lung examinations which resulted negatively, 18 were accompanied by signs of coccidiosis. These results show that Bact. septicemiae gallinarum has a high pathogenicity for young chicks, especially when associated with cases of coccidiosis or white diarrhea, but that it is not the only pathogenic organism accompanying coccidiosis.

Literature.

- 1895 Smith, Theobald, An infectious disease among turkeys caused by Protozoa. (Infectious entero-hepatitis.) (U. S. Dept. Agr. Bur. Animal Ind. Bull. No. 8. p. 7—38. Pls. 1—6.)
 1899 Salmon, D. E., The diseases of poultry. Washington D. C. (Geo. E. Howard Co. p. 1—246.)
 1903 Eckhardt, Ueber Coccidiosis intestinalis beim Geflügel. (Berl. tierärztl. Wochenschrift. 1902. Jahrg. 1903. No. 11. p. 177.)
 1903 Harrison, F. C., and Streit, H., Roup: An experimental study. (Ontario Agricultural College Bulletin. No. 132. p. 1—47.)
 1906 Morse, Geo. B., White diarrhea of chicks. With notes on coccidiosis in birds. (U. S. Dept. Agr. Bur. Animal Ind. Circular No. 128. p. 1—7.)
 1908 Rettger, L. F., Fatal septicemia in young chicks or "White diarrhea". (Journ. Med. Res. N. S. XIII. p. 277—290.)

Nachdruck verboten.

Ueber die Milzbrandimmunität des Hundes.

[Aus dem Institute für Allgemeine Pathologie zu Moskau.]

Von Dr. G. P. Sacharoff.

Die Frage über den Mechanismus der Milzbrandimmunität hat sich in der letzten Zeit sehr lebhaft entwickelt. Da alle hierzu gehörigen Tatsachen sich nicht vom Standpunkte irgendeiner einzelnen Theorie erklären lassen, so ist diese Frage das Thema neuer systematischer Forschungen geworden, die auf neue Standpunkte hingewiesen und neue Bahnen in der Immunitätslehre eröffnet haben. In dieser Beziehung kommen Bail und Pettersson ein bedeutendes Verdienst zu, und dürfte es ihren hervorragenden Forschungen vorbehalten sein, nicht nur für die Erklärung der Milzbrandimmunität, sondern auch für die Immunitätslehre im allgemeinen eine große Bedeutung zu gewinnen. Da aber auf diesem Gebiete bislang nicht alles klar ist, so scheint uns ein kurzer Ueberblick der obengenannten Frage durchaus nicht überflüssig. Im Vorliegenden erlaube ich mir daher einige Gedanken über die Frage der Milzbrandimmunität des Hundes darzulegen.

Daß die im Organismus des Hundes getrennt zirkulierenden Komponenten der bakteriziden Stoffe (der Ambozeptor des Serums und das Komplement der Leukocyten) jedenfalls keine entscheidende Rolle in dem Kampfe des Tieres mit dem Milzbrand spielen, kann ich auf Grund auch

eigener Beobachtungen vollkommen bestätigen. So habe ich mich davon überzeugen können, daß zwischen der Menge des Ambozeptors im Serum des Hundes und dem Grade der Widerstandsfähigkeit des Tieres gegen die genannte Infektion kein scharf ausgesprochener Konnex vorhanden ist. Es fragt sich jedoch, ob man der kategorischen Behauptung Petterssons, daß das Vorhandensein der genannten Stoffe im Organismus in diesem Falle (vom Standpunkte der Immunität aus) ganz bedeutungslos ist, unbedingt beitreten kann, und ob die zugunsten dieser Behauptung angeführten Beweise wirklich so unwiderlegbar sind. Pettersson¹⁾ schreibt die schützende Rolle ausschließlich den Leukocyten zu, und zwar auf Grund folgender Betrachtungen:

1) Werde bei der Immunisation der Hunde die Menge des im Serum befindlichen Ambozeptors nicht größer;

2) würden bei Gegenwart der Organe die Leukocyten des immunisierten Hundes allein eine beinahe ebenso starke bakterizide Wirkung an den Tag legen, wie dieselben Leukocyten und unter denselben Umständen, aber im Verein mit dem Hundeserum;

3) bedinge der Immunisationsprozeß in den Leukocyten des Hundes eine Anhäufung selbständiger, mit den „Alexinen“ nicht identischer bakterizider Stoffe, deren Selbständigkeit sich erstens durch ihre Thermostabilität (sie zersetzen sich erst bei 60°), zweitens dadurch kundgebe, daß sie, im Gegensatz zum Komplement, nicht von den Leukocyten in das Medium sezerniert werden.

In bezug auf den ersten Punkt ließe sich folgendes sagen: Pettersson immunisierte die Hunde gegen den Milzbrand nicht nur subdermal, sondern auch intravenös und intraperitoneal. In den größeren Gefäßen (nicht Kapillaren) zirkuliert aber der Ambozeptor sicherlich frei, wovon man sich durch die Untersuchung aus der Carotis entnommenen Blutes leicht überzeugen kann. Folglich ist den in das Blutsystem eingetragenen und dort eine gewisse, wenn auch sehr kurze Zeit²⁾ zirkulierenden Bakterien die Möglichkeit geboten, den Ambozeptor auf sich zu fixieren, und tun sie es wahrscheinlich auch wirklich.

Auch in der Bauchhöhle des Hundes befindet sich, wie schon erwähnt, der Ambozeptor wahrscheinlich außerhalb der Wirkungssphäre der Organe; somit wird sowohl bei der intravenösen als auch insbesondere bei der intraperitonealen Immunisation ein Teil des Ambozeptors des Serums nicht nur wahrscheinlich, sondern fast unzweifelhaft von den Bakterien gebunden, trotzdem eine Hyperproduktion dabei nicht beobachtet wird. Wie läßt sich dies nun wohl erklären?

Da wir eine kategorische Antwort auf diese Frage nicht wagen möchten und nur betonen wollen, daß das Fehlen einer Hyperproduktion des Ambozeptors bei der Immunisation die Bindung, folglich auch den Verbrauch desselben durch die Bakterien nicht ausschließt, so erlauben wir uns die Aufmerksamkeit auf folgende Betrachtungen zu lenken, ohne daß wir einen bestimmten Schluß daraus ziehen wollen:

Der im Blute zirkulierende oder im peritonealen Exsudat befindliche bakterizide Ambozeptor ist nichts anderes als eine Anzahl abgestoßener

1) Centralbl. f. Bakt. etc. Abt. I. Orig. Bd. XXXIX. Heft 4. p. 437 u. Heft 5. p. 617. 619.

2) Wie kurze Zeit zur Fixierung des Ambozeptors manchmal erforderlich ist, zeigen Beobachtungen über das Pfeiffersche Phänomen; man kann nämlich schon nach 5 Min. die Wirkung des Immunserums auf die in das Peritoneum des immunisierten Meerschweinchens eingetragenen Vibrionen bemerken.

Zellrezeptoren, die mit den Mutterzellen in keinerlei Verbindung mehr stehen und als solche diesen gegenüber als „Giftableiter“ dienen müssen. Folglich müssen die Bakterien, ehe sie die unbeweglichen, sozusagen sessilen, d. h. auf den Zellen fixierten Zellrezeptoren erreichen, mit den obenerwähnten freien, abgestoßenen Rezeptoren in Verbindung treten, ähnlich wie die Toxine, wenn sie im Organismus freie Antitoxine antreffen, sich mit diesen verbinden, bevor sie die toxinophilen Gruppen der für das Leben wichtigen Organe erreicht haben. Solange der ganze Vorrat an freien Ambozeptoren nicht verbraucht ist, scheint es den Zellen an einem Anstoß zu fehlen, durch Hyperproduktion der entsprechenden Rezeptorengruppen zu reagieren, da die Zellen selbst von den Bakterien unangetastet bleiben. Hier dürfte also ein Prozeß stattfinden ähnlich demjenigen, der in D u n g e r n s Versuchen bei der Immunisation von Tieren mit vom Ambozeptor „beladenen“ Erythrocyten und zum Teil in Neissers und Lubowskis Versuchen bei der Immunisation mit Typhusbacillen, die vorher mit Agglutininen „gesättigt“ worden waren, beobachtet wurde; es kann nämlich die Immunreaktion, d. h. die Hyperproduktion der Rezeptoren, ganz ausbleiben¹⁾. Natürlich hängt alles davon ab, ob zur Sättigung der Bakterien, sozusagen der Verstopfung aller ihrer rezeptorischen Gruppen, folglich auch zur Ablenkung der Bakterien von den Zellen eine genügende Menge von Ambozeptoren vorhanden ist. Ist die Menge der eingetragenen Bakterien sehr groß, so ist dies zweifelhaft, besonders wenn man die von Pfeiffer und Friedberger konstatierte Tatsache berücksichtigt, daß es sehr großer Mengen des spezifischen Ambozeptors bedarf, um die Choleravibrionen zu „sättigen“, obgleich die Milzbrandbakterien den Choleravibrionen in dieser Beziehung nachstehen dürften. Wenigstens haben wir beobachten können, daß 1, häufig sogar 2 Tropfen einer dichten Milzbrandemulsion zum Fixieren des in 1 ccm Hundeserum enthaltenen Ambozeptors nicht genügten. Wir wiederholen also noch einmal, daß das Fehlen einer wahrnehmbaren Hyperproduktion des Ambozeptors bei der Immunisation des Hundes gegen den Milzbrand dessen Verbrauch durch die Bakterien noch nicht ausschließt, und daß es mehr als wahrscheinlich ist, daß bei der intravenösen und intraperitonealen Inokulation ein solcher auch wirklich bis zu einem gewissen Grade statt hat. Immerhin aber bleibt es unaufgeklärt, warum unter diesen Umständen keine Hyperproduktion stattfindet²⁾.

Andererseits gibt es eine Beobachtung von Bordet und Gengou, die zu allem, was uns bislang über die gegen Milzbrand immunisierten Tiere bekannt geworden ist, in scharfem Gegensatz zu stehen scheint: Es ist diesen Forschern nämlich gelungen, im Serum gegen das 1. Milzbrandvaccin immunisierter Meerschweinchen das Vorhandensein des spezifischen Fixators zu konstatieren³⁾. Wir haben es hier also mit derselben Hyperproduktion der als bakterizider Ambozeptor funktionierenden Rezeptoren zu tun, deren Vorhandensein bei der Immunisation anderer Tiere zu beweisen noch nicht gelungen ist⁴⁾.

1) Ehrlich, „Gesammelte Arbeiten“. p. 55, 216.

2) Bemerken wir noch beiläufig, daß der Verbrauch des Ambozeptors seitens der Bakterien keineswegs von sichtbaren Veränderungen in dessen Gehalt begleitet sein muß, da es keinem Zweifel unterliegt, dass, wenn die freien Rezeptoren nutritiven Zwecken dienen, der Organismus fähig ist, den Verlust sehr schnell zu kompensieren.

3) Annales de l'Inst. Pasteur. T. XV. 1901. p. 294—295.

4) Die Wertschätzung der von Bordet und Gengou erhaltenen Resultate wird leider durch den Umstand erschwert, daß das Serum auch bei normalen Meerschweinchen zuweilen (doch nicht immer) eine gewisse Menge bakteriziden Ambozeptors enthält, eine

Was den zweiten Beweisgrund anbetrifft, so widersprechen unsere eigenen Beobachtungen den von Pettersson beschriebenen und weisen, im Gegensatz zu dem Schlusse, den dieser Autor aus den seinigen zieht, auf die Möglichkeit eines partiellen Uebergangs des Ambozeptors des Serums auf die Bakterien hin, eines Uebergangs, der die bakterizide Wirkung der Leukocyten verstärkt¹⁾ (die Mischung: Leukocyten eines Hundes + Hundeserum + Organe brachte in unsern Versuchen eine stärkere bakterizide Wirkung hervor als die Leukocyten allein, oder die Leukocyten + die Organe, aber ohne das Serum). Doch scheinen uns diese Resultate nicht so ganz unvereinbar, und dürften bei einer sorgfältigeren Analyse der Versuchsbedingungen sich die in diesem und jenem Falle gewonnenen Ergebnisse in Einklang bringen lassen.

Die Sache verhält sich wie folgt: Petterssons Schlüsse gründen sich auf Beobachtungen immunisierter Tiere, während unsere Versuche an normalen Hunden angestellt wurden. Petterssons Worten nach würden nun die Leukocyten des Hundes selbständige, von den „Alexinen“ unterschiedliche bakterizide Stoffe enthalten, zugleich müsse man aber das Vorhandensein auch eines bakteriolytischen Komplements in denselben zugeben, da eine halbstündige Erhitzung der Leukocytenemulsion bei 56° den Leukocyten die Fähigkeit raube, den Ambozeptor zu aktivieren, obgleich es etwas befremdlich scheint, warum dieses Komplement nicht in das Serum übergehen sollte. Somit wären in vitro bei einer kombinierten Wirkung von Serum und Leukocyten die Bedingungen zu zwei Prozessen gegeben: Erstens zur Aktivierung des Ambozeptors des Serums durch das Komplement und dadurch zur Bildung eines vollkommenen Bakteriolytins, welches die Bakterien verdaut; zweitens zur Vernichtung der Bakterien durch den Einfluß selbständiger, schon früher für die Einwirkung fertiger Stoffe, die sich ausschließlich in den Leukocyten befinden. Dabei sind zwei Möglichkeiten vorhanden, nämlich entweder finden beide Prozesse gleichzeitig statt, und der Effekt summiert sich, oder es entsteht eine gewisse Konkurrenz, und es kommt derjenige zur Wirkung, der die vorteilhaftesten Bedingungen für sich vorfindet. Beim Vorhandensein großer Mengen des freien Ambozeptors wäre wohl die gleichzeitige Existenz der beiden Prozesse kaum möglich, da die Bakterien, noch ehe die bakteriziden Stoffe der Leukocyten ihre Wirkung entfalten können, schon Zeit gehabt haben, den Ambozeptor zu binden und der Wirkung des Komplements allein zugänglich zu werden, d. h. es besteht in betreff der bakteriziden Stoffe der Leukocyten eine Art Ablenkung der mikroboziden Wirkung.

Andere Erscheinungen sind in dem Falle zu erwarten, wenn bei Gegenwart der Organe nur ein Teil des Ambozeptors und dabei in einer für die Verstopfung des rezeptorischen Apparats bei allen Mikroorganismen ungenügenden Menge auf die Bakterien übergeht. Dann kann folgendes geschehen: Die Bakterien, die den Ambozeptor verbunden haben, unterliegen der zerstörenden Wirkung des Komplements, während die übrigen durch Stoffe ausschließlich leukocytalen Ursprungs zugrunde gehen. Von der proportionalen Teilnahme beider genannten Prozesse dürfte es abhängen, ob die Mischung: Leukocyten + Serum + Organe auf die Bak-

Tatsache, die den Autoren damals nicht bekannt war. Uebrigens läßt sich der Umstand, daß bei vaccinierten Meerschweinchen der Fixator jedesmal konstatiert wurde, während er bei den normalen Kontrolltieren immer fehlte, kaum durch ein rein zufälliges Zusammentreffen erklären.

1) Es ist erwähnenswert, daß anfänglich auch Pettersson obigen Satz anerkannte.

terien eine stärkere Wirkung ausüben wird, als die Leukocyten allein oder die Mischung Leukocyten + Organe, aber ohne Serum, oder ob die Wirkung fast die nämliche ist. Man darf annehmen, daß die Leukocyten der normalen Hunde nicht sehr viele selbständige bakterizide Stoffe enthalten, jedenfalls weniger als die Leukocyten immunisierter; daher dürfte im ersten Falle der durch diese Stoffe hervorgerufene Prozeß der Vernichtung der Mikroben den zweiten Prozeß, dessen Wirkungsstoff auch ein Bakteriolyisin, aber von ganz anderem Ursprung und Charakter (Leukocytenkomplement + ein Teil des Ambozeptors des Serums) ist, sozusagen nicht verdunkeln. Da der Zusatz von Hundeserum es möglich macht, daß ein Teil des Ambozeptors auf die Bakterien übergeht, so muß er unter solchen Umständen der mikroboziden Wirkung merklichen Vorschub leisten; im andern Falle dagegen muß eine Ansammlung spezifischer bakterizider Stoffe in den Leukocyten unter dem Einfluß der Immunisation gerade diesen ein entscheidendes Uebergewicht verleihen, während der vom Bakteriolyisin serum-leukocytalen Ursprungs abhängende Vernichtungsprozeß in den Hintergrund tritt, infolgedessen ein Serumzusatz keine merklichen Folgen, im Sinne einer wahrnehmbaren Steigerung der bakteriziden Wirkung ¹⁾, hat.

Dieser Auseinandersetzung lassen sich jedoch folgende Betrachtungen entgegenstellen. Die Mischung Serum + Leukocyten + Organe übt, unseren Versuchen nach, bei gesunden Hunden gewöhnlich eine schwächere bakterizide Wirkung aus, als Serum + Leukocyten ohne Organe, aber eine stärkere als die Leukocyten allein. Dies alles der ausschließlichen Wirkung der bakteriziden Stoffe der Leukocyten zuzuschreiben, ist unzulässig, da in diesem Falle die Wirkung der erwähnten Mischung höchstens der Wirkung der Leukocyten allein gleichkommen, dieselbe aber durchaus nicht übertreffen könnte. Folglich ist hier die Mitwirkung des Bakteriolyisins serum-leukocytalen Ursprungs (ein Teil des Ambozeptors des Serums + Leukocytenkomplement) unbedingt vorhanden, — die Frage ist nur, ob unter den genannten Umständen dieses Bakteriolyisin allein wirkt, oder ob gleichzeitig beide an der Vernichtung teilnehmen. Wirkt es allein, so beschränkt sich die Rolle der Leukocyten nur auf die Zustellung des für die Aktivierung des Ambozeptors nötigen Komplements, und würden die selbständigen bakteriziden Stoffe, die sich in den Leukocyten befinden, dann als bedeutungslos zu betrachten sein. Das Dargelegte bezieht sich auf die Experimente *in vitro*. Die Bedingungen, die sich im Organismus des lebendigen Hundes vorfinden, scheinen für die Wirkung der Leukocyten günstigere zu sein. Dies erhellt aus der Tatsache, daß die bakteriziden Stoffe dieser letzteren unter dem Einflusse der Immunisation an Menge zunehmen. Daraus folgt jedoch noch nicht, daß das Bakteriolyisin serum-leukocytalen Ursprungs nicht doch an der Beschützung des Organismus gegen die Milzbrandbakterien teilnehmen könne.

Die Beweiskraft des dritten der angeführten Argumente scheint uns durch folgende Erwägungen beeinträchtigt zu werden: Der ausschließ-

1) Zur besseren Erläuterung unseres Gedankens nehmen wir folgendes Beispiel: Nehmen wir an, daß sowohl bei einem normalen als auch bei einem immunisierten Hunde die zur Wirkung taugliche, d. h. durch Organe nicht fixierte Ambozeptormenge zur Vernichtung von 1000 Mikroben genügt, während die bakteriziden Stoffe der Leukocyten ungleiche Mengen des Ansteckungsstoffs zu vernichten vermögen, sei es im ersten Falle ebenfalls 1000, im zweiten — 100 000, so wird unter diesen Umständen der Effekt eines Serumzusatzes in beiden Fällen ein anderer sein: Bei dem Normalhunde wird die Menge der vernichteten Bakterien das Doppelte betragen, während bei dem immunisierten Tiere eine Verstärkung der mikroboziden Wirkung kaum wahrnehmbar sein wird.

lichen Bedeutung der Leukocyten würde erstens der Mangel an einer strengen Korrelation zwischen der Intensität der antibakteriellen Wirkung der Leukocyten und der Empfindlichkeit des Tieres gegen die Infektion widersprechen. So war in Bails und Petterssons Experimenten die bakterizide Wirkung der Leukocyten eines Hundes *in vitro* eine außerordentlich starke; trotzdem erwies sich die Widerstandskraft des Tieres gegen verhältnismäßig geringe Dosen (1 ccm Bouillonkultur) Milzbrandkulturen (in Abhängigkeit von der Rasse) als sehr gering. In unseren Experimenten dagegen war die umgekehrte Erscheinung zu bemerken, nämlich erwachsene Hunde erwiesen sich in den meisten Fällen sogar bei größeren Dosen (5–10 ccm Bouillonkultur) immun, trotz der verhältnismäßig schwachen Wirkung der Leukocytenemulsion. Wenn letzteres (die schwache Wirkung der Leukocyten) zum Teil von der Technik abhängen konnte, so darf man sich aber wohl fragen, wodurch sich der obenerwähnte Mangel an Korrelation in Bails und Petterssons Experimenten erklären ließe.

Ferner scheint uns die Ansammlung bakterizider Stoffe in den Hunde-leukocyten unter dem Einflusse der Immunisation eine zu wenig bedeutende, um dieselben als das einzige Schutzmittel des Organismus gegen den Milzbrand ansehen zu können. Diese Betrachtung bezieht sich besonders auf die Experimente Petterssons mit dem Knochenmark. Pettersson¹⁾ fand, daß die Immunisation des Hundes gegen den Milzbrand die bakterizide Kraft ihres Knochenmarks etwas erhöhte, und erklärte diese Erscheinung zuerst durch die Vermehrung des Komplements, brachte sie aber später in einen Konnex mit der Hyperproduktion der in den Leukocyten enthaltenen bakteriziden Stoffe. Schwerer aber läßt sich folgendes erklären: Erstens ist der Unterschied zwischen der Wirkung des einen und des anderen Marks ein im allgemeinen so geringer, daß Pettersson selbst es für unmöglich hielt, die Widerstandskraft des immunisierten Tieres gegen die Infektion durch die Hyperproduktion der soeben erwähnten Stoffe zu erklären. Ist aber dies der Fall, so müssen die Stoffe, welche der Autor für das einzige Schutzmittel des Hundes im Kampf mit dem Milzbrand anerkannte (wenn man nur die bakteriziden Stoffe des Knochenmarks und der Leukocyten nicht für verschiedenartig hält, was übrigens kaum wahrscheinlich ist) und welche, wenn diese Voraussetzung richtig ist, bei der Immunisation des Tieres in großer Menge verbraucht werden müssen, sich, im Gegensatz zu der gewöhnlichen Sachlage, verhältnismäßig in unbedeutendem Grade vermehren. Zweitens bleibt die Natur der erwähnten Stoffe ganz rätselhaft. Darf man etwa sagen, daß die Immunisation zur Hyperproduktion des Komplements geführt hat? Nein, da bei der Immunisation, soweit es jetzt bekannt ist, nur die Menge des Ambozeptors sich vergrößert, das Komplement aber keine Hyperproduktion erfährt. Bedeutet dies, daß als Resultat der Immunisation eine Ansammlung bakterizider Stoffe *sui generis* stattgefunden hat, wie Pettersson denkt? In diesem Falle müßte man aber einen Unterschied in der Wirkung des einen und des anderen Knochenmarks erwarten, gleichviel in was für einem Medium, Serum oder physiologische Kochsalzlösung, das Organ suspendiert war. Ein Unterschied erweist sich indessen nur bei der Suspension im Serum, in einer Salzlösung dagegen verschwindet er (ein Resultat, welches gleichsam auf eine Hyperproduktion des Komplements hindeutet).

1) Centralbl. f. Bakt. etc. Abt. I. Orig. Bd. XXXVI. Nr. 1. p. 80.

Zum Schlusse erlaube ich mir die Aufmerksamkeit noch auf folgendes zu lenken: Auf Grund der unlängst publizierten Forschungen Grubers und Futakis¹⁾ würden die Milzbrandbacillen im Unterhautgewebe des Hundes zugrunde gehen, aber nicht durch Phagocytose, sondern extracellulär, während der Mechanismus des Schutzes des Organismus in der Sezernierung bakterizider Stoffe durch die Leukocyten, jedoch unter dem Einfluß gewisser Stoffe, die sich in der subkutanen Lymphe befinden, bestehe. Es erscheint nicht ganz klar, wodurch ein solcher Prozeß des Selbstschutzes von der kombinierten Wirkung des Ambozeptors und des Komplements sich unterscheidet. Obgleich wir, im Gegensatz zu Gruber und Futaki, mehrmals Gelegenheit gehabt haben, uns von einer scharf ausgeprägten Phagocytose und einer intracellulären Vernichtung der Milzbrandbacillen bei subdormaler Ansteckung beim Hunde zu überzeugen, so können die Beobachtungen der obengenannten Autoren jedenfalls noch als weiterer Beweis dafür dienen, daß die Frage des Mechanismus der Immunität des Hundes gegen den Milzbrand bislang noch nicht ganz aufgeklärt ist, und daß die Leukocyten dieser Tiere zwar für ein höchst wichtiges, jedoch möglicherweise nicht für das einzige Schutzmittel des Organismus gegen die Infektion anzusehen sind.

Nachdruck verboten.

Untersuchungen über Hämolyse bei Coli- und anderen Darmbakterien.

[Aus dem Hygienischen Institut zu Kiel (Geh. Rat B. Fischer).]

Von Dr. med. **Th. Schmidt,**

ehemaligem Assistenten am Untersuchungsamt für ansteckende Krankheiten.

Mit 2 Tabellen.

Die bisher bekannten Veränderungen, die rote Blutkörperchen durch Bakterien und deren Produkte erleiden, sind in dem Kolle-Wassermannschen Handbuche in einer Arbeit von Přibram dargestellt worden. Zur Klärung des Begriffes „Hämolyse“ muß man zweierlei auseinanderhalten: 1) Das bloße Freiwerden des Hämoglobins aus den Erythrocyten (Lackfarbenwerden). 2) Die Zerstörung des Hämoglobins, d. i. Verschwinden der roten Farbe. Přibram unterscheidet 3 Gruppen hämolysierender Bakterien: a) solche mit echten filtrierbaren Hämotoxinen; b) solche mit hitzebeständigen Hämotoxinen; c) Bakterien ohne Hämotoxinbildung, die aber doch unter bestimmten Bedingungen rote Blutkörperchen auflösen; er rechnet hierzu auch alle, welche die im Agar eingeschlossenen Erythrocyten zerstören. Přibram benutzte, was hervorzuheben ist, bei seinen Versuchen Kaninchenblut, und fand nun, daß fast alle Bakterien imstande sind, auf Kaninchenblutagar eine Auflösung der roten Blutkörperchen hervorzurufen. Bei seiner Versuchsanordnung sah er im allgemeinen auf der Blutagarplatte zweierlei: 1) ein Verschwinden der roten Blutkörperchen und des roten Blutfarbstoffes „rings um jede Kolonie“, 2) eine diffuse Aufhellung der ganzen Platte, so daß sie rot durchsichtig, lackfarben wird. Daß die Verhältnisse bei Verwendung anderen Blutes sich wesentlich ändern, darauf wird später zurückzukommen sein.

1) Münch. med. Wochenschr. 1907. Nr. 6.

Es war ein fruchtbringender Gedanke, die Hämolyse zur Bakterien-differenzierung zu verwenden. Schottmüller baute darauf seine Einteilung der Streptokokken auf und gab Veranlassung zu weiteren Untersuchungen.

Die vorliegende Arbeit will behandeln, ob und in welcher Weise rote Blutkörperchen und Blutfarbstoff durch Bakterien der Coli-Gruppe auf Blutagar verändert werden. Dabei brachte es der Gang der Untersuchung mit sich, daß auch einige andere Darmbakterien daraufhin geprüft wurden.

So groß die Literatur über die Coli-Bakterien ist, diese spezielle Eigenschaft hat bisher wenig Berücksichtigung gefunden. Přibram fand bei Züchtung von Coli-Bakterien auf Blutagar (Kaninchenblut!) die Platte nach 24 Stunden durchsichtig, meist ganz gleichmäßig diffusrot. In einigen Fällen sah er eine Aufhellung um die Kolonien, doch niemals eine Hofbildung mit Verschwinden des Blutfarbstoffes. Ebenso wie Neisser und Wechsberg das Blut verschiedener Tiere durch Staphylotoxine verschieden angreifbar fanden, konstatierte Kayser, daß durch die Coli-Lysine in Blutbouillon am leichtesten Hundeerythrocyten aufgelöst werden. Geringer ist die Wirkung auf Pferde-, Rinder- und Kaninchenblut. Ganz unwirksam ist das Coli-Lysin bei Verwendung von Menschen-, Meerschweinchen-, Tauben-, Gänse- und Schafblut. Dieses verschiedene Verhalten der in Bouillonkulturen beobachteten Coli-Lysine erscheint auch wichtig für die Beurteilung von Blutfarbstoffveränderung auf Blutagarplatten.

Mandelbaum berichtet in einer Arbeit über seinen *Metatyphus bacillus* auch über Blutfarbstoffveränderung durch Coli-Bakterien auf Menschenblutagar. Er fand, daß seine Coli-Stämme nur die Blutkörperchen angreifen, die unmittelbar unter der Kolonie liegen. Das Rot der Blutkörperchen soll dabei in einen blauvioletten Ton übergehen, oft vermischt mit grünlichen Streifen. Häufig soll auch die grünlichgelbe Farbe überwiegen und von blauvioletten Streifen durchsetzt sein. Besonders hebt er hervor, daß diese Umwandlung der roten Blutkörperchen niemals über die Kolonie hinausgeht in 24 Stunden.

In einer der neuesten hierauf bezüglichen Arbeiten, der von Burk aus dem Kieler Institut, wurde eingehender auch das Verhalten der Coli-Stämme auf Ziegenblutagar geprüft. Er fand unter 139 Stämmen, die er im Impfstrich prüfte, daß sich bei 8 Stämmen um den Impfstrich ein scharf begrenzter heller Hof zeigte, in dessen Bereich der rote Blutfarbstoff völlig verschwunden war. In einer mit defibriniertem Blut versetzten Bouillon gezüchtet, riefen auch nur diese Stämme unter den 139 eine Hämolyse der roten Blutkörperchen hervor, so daß die Bouillon lackfarben rot wurde. Die 8 Stämme zeigten unter sich Verschiedenheiten. Stövesandt züchtete aus einer Lumbalflüssigkeit einen Coli-Stamm, der dasselbe Verhalten zeigte.

Much und Schottmüller untersuchten neuerdings den opsonischen Index der Sera von Gastroenteritis-Patienten gegenüber Coli-Stämmen und fanden dabei eine Coli-Art, die auf Blutagar einen „Resorptionshof“ bildet. Sie nennen dieses Stäbchen, dem sie bei den Erkrankungen eine ursächliche Bedeutung zuschreiben, *Bacterium coli haemolyticum*; es zeichne sich vor den gewöhnlichen Stämmen nur durch diese Eigenschaft aus.

Es dürfte sich daher verlohnen, einmal eingehender zu prüfen, in welcher Weise die Coli-Bakterien die Blutagarplatte verändern und ob

sich auf Grund dieser Eigenschaft eine umschriebene Gruppe aus den vielen Coli-Varietäten herausheben läßt.

Zunächst etwas über Herstellung der Blutagarplatten: Schottmüller und, auf dessen Methode fußend, Mandelbaum setzten zu 5 ccm Agar 2 ccm Menschenblut. Přibram nahm $\frac{1}{2}$ bis 1 Teil Kaninchenblut zu 10 Teilen Agar. Im Kieler Institut wird seit Jahren Ziegenblutagar (1:10) benutzt, der sich im allgemeinen als Nährboden außerordentlich bewährt hat (Herstellung: Centralbl. f. Bakt. Orig. Bd. XLI. p. 519). Daß Aenderungen in der Blutkonzentration den Grad der Blutfarbstoffzerstörung beeinflussen, darauf hat schon Schottmüller bei seinen Streptokokken-Untersuchungen aufmerksam gemacht.

Als Ausgangsmaterial benutzte ich zunächst die dem hiesigen Untersuchungsamt zur Untersuchung auf Typhus eingesandten Stuhlproben, ferner solche von Gesunden, dann einige Urin- und Eiterproben.

Von dem Kote wurde eine volle Oese aus der Mitte der Masse herausgehoben und in 5 ccm physiologischer Kochsalzlösung gut verrieben. Von dieser Aufschwemmung wurden 5—10 Oesen auf eine größere Blutagarplatte von 15 cm Durchmesser ausgesät; so wuchsen schön einzelnstehende Kolonien. Auch darauf wurde geachtet, daß die Nährbodenschicht immer annähernd gleich dick war. Im Gegensatz zum Impfstrich, bei dem die Dichte der Kulturmasse Veränderungen des darunterliegenden Nährbodens weniger deutlich macht, zeigen isoliert stehende Einzelkolonien besser die Farbenveränderung unter der Kolonie und in deren Umgebung. Bei der direkten Aussaat auf Blutagarplatten war vermieden, daß die hämolytische Kraft der Coli-Bakterien durch Fortzüchten auf anderen Nährboden Einbuße erlitt.

Es wurden untersucht:

90 Faecesproben, davon 73 von Typhusverdächtigen, 17 von Gesunden.

6 Urinproben, davon 5 von Tuberkuloseverdächtigen, 1 von Typhusverdächtigem.

5 Eiterproben, worin Coli-Bakterien vermutet wurden.

1 Blutprobe von einer wahrscheinlichen Coli-Sepsis.

Als „Coli“ wurden nur gramnegative, keine sporenbildenden Stäbchen verwendet, die auf dem v. Drigalski-Conradischen Lackmus-Laktose-Agar rot wuchsen, Indol bildeten, Milch koagulierten und Gelatine nicht verflüssigten.

Auf einer in der angegebenen Weise besäten Blutagarplatte sind die Coli-Kolonien meist feucht glänzend, von bläulich grauer Farbe, bisweilen mehr weißlich. Die Farbenveränderung erkennt man am besten bei der Durchsicht. Auf Grund meiner zahlreichen Untersuchungen möchte ich nun 3 Stufen der Blutfarbstoffveränderung unterscheiden wie sie nach 24-stündigem Wachstum bei 36° erkennbar sind.

1. Am ehesten in die Augen fallend sind die Kolonien mit vollkommen hellem durchsichtigen Hofe. Im Bereiche dieses Hofes wie auch der Kolonie ist der rote Farbstoff vollständig zerstört, verschwunden. Die Breite des Hofes ist bald größer bald kleiner, und erreicht bei einigen Kolonien die Hälfte des Durchmessers der Kolonie und selbst mehr. Bei manchen Stämmen sind die Kolonien auffällig klein, wasserklar und von einem breiten Hofe umgeben. Die Kolonie selbst ist auch durchscheinend. Hebt man eine solche Kolonie vom Nährboden ab, so erblickt man innerhalb des undurchsichtigen roten Blutagars einen hell durchsichtigen, klaren, scharf umschriebenen Kreis. Einzelne solcher Stämme wurden auch kurze Zeit nach der Isolierung im

Impfstrich geprüft. Dieser zeigte sich in gleicher Weise von einem durchsichtigen Hofe umgeben.

2. Eine zweite Gruppe zeigte folgendes: Der Untergrund der Kolonie ist weniger durchsichtig, rings um die Kolonie ist kein durchsichtiger Hof, sondern nur ein heller Saum zu sehen, einem Glorionschein vergleichbar. Nur in Stellen, wo die Nährbodenschicht sehr dünn ist, kann dieser Saum wohl ganz durchsichtig werden, erreicht aber nie die Breite der Höfe.

3. Eine dritte Gruppe zeichnet sich dadurch aus, daß eine Veränderung des Blutfarbstoffes nur unter der Kolonie zu sehen ist. Es ist keine vollständige Zerstörung (Verschwinden) des Blutfarbstoffes eingetreten; infolgedessen ist die Kolonie weniger durchscheinend. Hebt man die Kolonie ab, so sieht man innerhalb der roten Fläche einen umschriebenen weiß-gelben, selten weiß-grünlichen Kreis. Diese Veränderungen sind bei durchfallendem Licht durch die Kolonie hindurch deutlich zu sehen. Im Sinne einer derartigen verschieden starken Zerstörung des Blutfarbstoffes auf Blutagar sei im folgenden der Ausdruck „Hämolyse“ verstanden.

Unter den 73 zur Untersuchung auf Typhus eingesandten Stühlen waren nur 20, in denen sich solche hämolysierende Coli-Bakterien nicht fanden, darunter von 3 Kranken mit bakteriologisch sicher gestelltem Typhus. Von den 53 typhusverdächtigen Stühlen mit hämolysierenden Coli-Bakterien stammten 11 bzw. 6 bzw. 1 von solchen Kranken, bei denen weiterhin Typhus- bzw. Paratyphus B- bzw. Enteritis- (Breslau) -Bacillen aufgefunden wurden. Von 17 Stuhlproben, die von 7 gesunden Personen aus verschiedenen Zeitabschnitten stammten, enthielten 11 hämolysierende Coli-Bakterien. Die zur Untersuchung eingeschickten Faeces stammten wohl meistens von Personen, bei denen eine Darmerkrankung, sei es typhöser oder sei es nichttyphöser Art, vorlag. Daraus ergäbe sich, daß sich im erkrankten Darm nicht wesentlich häufiger (72,6 Proz.) hämolytische Coli-Bakterien finden, als in den Stühlen Gesunder (65 Proz.). Vergleicht man das Vorkommen derartiger Coli-Stämme bei nachweislich Typhus- oder Paratyphuskranken (85 Proz.) und bei anderweitig Darmkranken (68 Proz.), so ergäbe sich, daß sie sich bei Typhus vielleicht etwas häufiger finden, als bei anderen Darmkrankheiten.

Aus allen 6 untersuchten Urinen wuchsen hämolytisch wirkende Coli-Kolonien (Tab. 13,1; 13,2; 12,2; 44; 11; 12,1; 37). Aus den Eiterproben wurden gezüchtet: Bei Appendicitis einmal hämolysierende, (Tab. 52) ein zweites Mal nicht hämolysierende Coli-Kolonien. In einem Bauchdeckenabsceß (Tab. 53) und in einem in den Darm perforierten Ovarialtumor (Tab. 63) fanden sich Coli-Stämme, die den Blutfarbstoff veränderten, dagegen nicht hämolysierende in einem Beckenabsceß und in dem Blute bei wahrscheinlicher Coli-Sepsis. Aus diesem Material wurden für weitere Untersuchungen 80 Coli-Stämme abgeimpft, die auf Blutagar Blutfarbstoff zerstörten. Sie gruppieren sich folgendermaßen:

I. Gruppe mit klarem Hof,		
Hof breit	24	Stämme
Hof schmal	8	„
Hof breit, Kolonie klein, wasserklar	6	„
II. Gruppe.		
Saumbildung, unter der Kolonie Aufhellung	22	„
III. Gruppe.		
Aufhellung nur unter der Kolonie	20	„

Miteinbegriffen sind in diese Uebersicht die paratyphusähnlichen Stämme 31, 2, 47 und 48 der Tabelle. Andere Darmbakterien, die den Blutfarbstoff auf der Blutagarplatte angreifen, werden später kurz berücksichtigt werden.

Es ist hervorzuheben, daß sich auch nach 3-tägigem Aufenthalt im Brutschrank ein Fortschreiten der Hämolyse und damit ein Uebergang in eine andere der 3 unterschiedenen Stufen der Hämolyse nicht beobachten ließ. Niemals sah ich bei unserem Ziegenblutagar, im Gegensatz zu den Beobachtungen, die Pribram auf Kaninchenblutagar machte, ein Lackfarbenwerden. Die Platte blieb, abgesehen von den Stellen, wo die Kolonien Veränderungen hervorgerufen, rot und undurchsichtig. Blieb die Platte länger als 2 oder 3 Tage im Brutschrank, so trat allmählich eine schmutzig schokoladenartige Verfärbung ein.

In der obigen Uebersicht fällt auf, daß die erste Gruppe wesentlich mehr Stämme umfaßt.

Da diese Gruppierung eine Stufenfolge der hämolytischen Wirkungsweise erkennen läßt, so könnte man ja daran denken, daß bei schweren Infektionen (Typhus) und Eiterungen besonders Stämme der 1. Gruppe vertreten wären. Diese Annahme findet keine volle Bestätigung, indem sich in 8 Typhusstühlen 4 Coli-Stämme der 1. Gruppe, je 2 der 2. und 3. Gruppe; in 4 Paratyphusstühlen 2 der 1. Gruppe und je 1 Stamm der 2. und 3. Gruppe fanden. In dem Appendicitiseiter fand sich ein Stamm der 3. Gruppe, in dem Bauchdeckeneiter 1 der 1. Gruppe. Bemerkenswert in dieser Hinsicht erscheint der Befund nicht hämolysierender Stämme in einem Beckenabsceß und im Blut bei wahrscheinlicher Coli-Sepsis.

Es wäre weiter zu berücksichtigen das Verhältnis hämolysierender und nicht hämolysierender Coli-Kolonien in derselben Stuhlaussaat. Da ergibt sich, daß die hämolysierenden nur in wenigen Fällen zahlreicher als die nicht hämolysierenden vorkommen. In 2 Stühlen fanden sich fast in Reinkultur Coli-Kolonien der Gruppe I (Stamm 38 und 49 der Tabelle); neben dem Stamm 49 wurden noch Paratyphusbakterien gezüchtet. Eine andere Stuhlaussaat zeigte fast nur solche mit Saum (Stamm 8a der Tabelle).

Aus einem Urin wuchsen fast nur Kolonien mit Hof (Stamm 48). Sonst waren hämolysierende Coli-Kolonien selten in der Mehrzahl; bei 10 waren sie in etwa gleicher Zahl wie die nicht hämolysierenden, in den übrigen Aussaaten gegenüber diesen in der Minderheit, bisweilen ganz vereinzelt auf einer großen Platte. Wie aus der Tabelle ersichtlich, kommen in demselben Stuhl Coli-Kolonien mit verschiedenen Graden der Hämolyse gleichzeitig vor. Die Zahlen hinter dem Komma bedeuten, daß mehrere Stämme aus demselben Stuhl isoliert wurden. Wenn nun aus dem gleichen Stuhl 2 Stämme mit den gleichen Zeichen der Blutfarbstoffveränderung geführt werden, so wurden sie doch als verschieden betrachtet, weil sie in der Größe der Hof- oder Saumbildung und der Intensität der Blutfarbstoffveränderung konstante Unterschiede zeigten.

Ausdrücklich hervorheben möchte ich noch einmal, daß ich ebenso wie Burk wohl Coli-Bakterien mit Hofbildung, dagegen nie ein Lackfarbenwerden der Platte beobachtet habe. Wenn Pribram und Mandelbaum zu anderen Resultaten kamen, so wird das wohl daran liegen, daß Pribram das leicht angreifbare Kaninchenblut, Mandelbaum Menschenblut in starker Konzentration (2:5) verwandte und zudem nur

wenige Stämme prüfte. So konnte ich auch bei vergleichshalber angestellten Versuchen nicht bestätigen, was Mandelbaum fand, daß Typhuskolonieen von einem „Hof mit grünlich-gelber Färbung“ umgeben seien. Auch nach 40-stündigem Verweilen im Brutschrank war nichts derartiges an den Typhuskolonieen zu beobachten. Es scheinen hiernach auf Blutagarplatten Blutart und -konzentration eine ganz wesentliche Rolle zu spielen. Wenn ich bei meinen Untersuchungen wesentlich mehr Stühle mit hämolytischen Coli-Stämmen fand, als Burk, so erklärt sich das ohne weiteres dadurch, daß Burk bei der Auswahl seiner Coli-Stämme ganz anders vorging, indem er seine Stämme von Lackmus-Laktose-Agarplatten abimpfte und erst später auf Blutagar prüfte, während ich direkt auf Blutagar aussäte.

Die bei einigen Gesunden nach mehrtägigen Pausen wiederholten Stuhluntersuchungen hatten das nachstehende Ergebnis: Stuhl M. wurde 5 mal in 5—10-tägigen Zwischenräumen untersucht. Das erste Mal fanden sich Kolonieen mit breiter Hofbildung neben den in der Mehrzahl vorhandenen nicht hämolytischen; das zweite Mal kleine wasserklare mit breitem Hof, daneben Kolonieen mit Saum; das dritte und vierte Mal nur nichthämolytische; das fünfte Mal 5 Kolonieen mit Saumbildung. — Im Stuhl Bl. fanden sich 3 mal nur nichthämolytische Kolonieen, 1 mal auf der ganzen Platte eine einzige mit Aufhellung im Bereich der Kolonie. — Aus Stuhl Sch. wurden 2 mal Kolonieen mit breitem Hof, 1 mal 5 im Bereiche der Kolonie hell durchscheinende und 1 mal nur nichthämolytische gezüchtet. — Stuhl L. zeigte das erste Mal nur nichthämolytische Kolonieen, das zweite Mal wenige mit Aufhellung unter der Kolonie. — Man wird auch nach diesen Befunden nur annehmen, daß der gesunde Mensch die verschiedensten Coli-Varietäten in seinem Darm beherbergt.

Es bliebe noch die Frage zu erörtern, ob hämolysierende Coli-Bakterien, lange auf künstlichen Nährböden fortgezüchtet, diese Fähigkeit in gleicher Weise beibehalten. Zur Beantwortung dieser Frage wurden nach 3—4 Monaten sämtliche Stämme, die bisher auf Gelatine weitergezüchtet waren, auf Blutagar nochmals geprüft, sowohl als Einzelkolonie wie im Impfstrich. Dabei ergab sich die auffallende Tatsache, daß 8 Stämme (5, 7a, 13a, 13b, 33, 37) diese Fähigkeit verloren hatten. Von diesen Stämmen gehörten auffälligerweise 5 der 3. Gruppe, 2 der 2. und 1 der 1. Gruppe an. Weiter ließ sich konstatieren: Diejenigen Stämme, welche früher klar durchscheinende, breite Höfe gezeigt hatten, bildeten in Einzelkolonieen jetzt meist klare, aber schmale Höfe. Bei einigen ließ sich auch nur noch Saumbildung konstatieren, oder wie bei 3 Stämmen nur noch totale Aufhellung unter der Kolonie. Auch die Impfstriche zeigten meist nur einen ganz schmalen durchsichtigen Hof. Die Auflösung des Blutfarbstoffes war aber in beiden Fällen vollständig, d. h. der Blutfarbstoff war verschwunden. Auch bei der 2. Gruppe war in den Einzelkolonieen die Saumbildung nicht mehr so deutlich. Bei der 3. Gruppe nahm die Aufhellung der Kolonieen teilweise nicht mehr den ganzen Bezirk der Kolonie ein, sondern ließ die Randpartieen unverändert rot. Die Abnahme der hämolytischen Kraft äußerte sich noch in einer anderen auffallenden Erscheinung. Bei 3 Stämmen der 1. Gruppe und bei einem der 2. zeigten sich bei der zweiten Aussaat neben derartigen scharf zu unterscheidenden hämolytischen auch solche Kolonieen, welche die Hämolyse vollständig eingebüßt hatten. Dabei waren von 2 Stämmen, die

früher Höfe gebildet hatten, die hämolytischen Kolonien nur noch von einem Saume umgeben (St. 26, 42, 50, 1 46, 1). Stamm 42 bot noch eine Eigentümlichkeit, die ich in diesem Zusammenhange vorwegnehme. Auf Saccharose-Endo-Agar zeigten sich nach 8 Tagen im Impfstrich auf der nicht geröteten Kulturmasse dunkelrote knopfähnliche Erhebungen. Nach Abimpfung von diesen Knöpfen und dem Kulturrasen auf Blutagar entstanden wieder hämolytische und nichthämolytische Kolonien nebeneinander. Auch hatte ich Gelegenheit, die schon erwähnten 8 Stämme, bei denen Burk im Sommer 1907 breite Hofbildung im Impfstrich konstatiert hatte, nachzuprüfen. Ein Stamm hatte diese Fähigkeit ganz verloren, bei den übrigen 7 konnte bei zweimaliger Prüfung am Impfstrich keine Hofbildung mehr konstatiert werden. Bei 4 Stämmen bestand nur im Bereich des Impfstriches totale Aufhellung und Zerstörung des Blutfarbstoffes. Von denselben Stämmen angelegte Einzelkolonien zeigten dagegen um die durchscheinende Kolonie einen allerdings schmalen, aber doch aufgehellten Hof. Bei den übrigen 3 Stämmen war der Impfstrich nur in der Mitte aufgehellt, die Randteile dunkel. Die entsprechenden Einzelkolonien waren wenig durchscheinend und zeigten Aufhellung nur unter der Kolonie.

Aus alledem geht klar hervor, daß die hämolytische Kraft der Coli-Bakterien bei Fortzüchtung auf künstlichen Nährböden (Gelatine) nachlassen, ja schwinden kann.

Zur Prüfung, wie die Colistämme auf Blut in flüssigen Nährböden einwirken, wurden sie auch zum Vergleich in Bouillon verimpft, welcher auf 2 ccm je 1 Tropfen einer 5-proz. Aufschwemmung gewaschener Ziegenblutkörperchen zugesetzt war. Nach 24 Stunden war in den meisten Röhrchen der Blutfarbstoff mehr oder weniger gelöst, so daß die Bouillon vollständig durchscheinend rot war. Bei den schon erwähnten 8 Stämmen, die nach 3—4 Monaten auf Blutagar keine Hämolyse mehr hervorriefen, trat auch in Bouillon kein Lackfarbigwerden ein, der rote Blutstropfen hatte sich in der Kuppe des Reagensglases abgesetzt. Nach 5 tägigem Aufenthalt im Brutschrank zeigte sich in weiteren 8 von 80 Kulturen, mit einer Ausnahme zur ersten Gruppe gehörig, die vorher rotgefärbte Bouillon nunmehr gelb und getrübt, und in der Kuppe des Glases ein weißer Bodensatz von der Größe des ehemaligen Blutropfens. Es war folglich der rote Blutfarbstoff vollständig verschwunden. Daß die roten Blutkörperchen nicht zerstört waren, bewies das mikroskopische mit Fuchsin gefärbte Präparat, worin die Stromata der roten Blutkörperchen als schwach rötliche Kreise neben den gut gefärbten Stäbchen sichtbar waren. Ähnlich wie auf Blutagarplatten war es also in diesen wenigen Fällen nach allerdings 5-tägiger Bebrütung nicht nur zur Auslaugung, sondern zur vollständigen Zerstörung des Blutfarbstoffes gekommen.

Im Anschluß an die von Escherich gemachte Beobachtung eines nicht fauligen, eigenartigen, an Limburger Käse erinnernden Geruches von Coli-Bouillonkulturen sei noch erwähnt, daß mir gerade auf Blutagar ein eigentümlicher, unangenehmer, stechender Geruch auffiel.

Nachdem die ersten Untersuchungen die 3 verschiedenen wiederkehrenden Stufen der Blutfarbstoffveränderung ergeben hatten, die zunächst auch eine gewisse Konstanz zeigten, lag es nahe, auf Grund dieser Unterschiede eine Gruppierung der hämolysierenden Coli-Stämme zu versuchen. Die nach 3 Monaten wiederholte Untersuchung zeigte aber ja nun, daß die hämolytische Kraft mit der Zeit sich verändert,

also keine scharfe Unterscheidung gestattet. Zu demselben Schlusse kam ich aber auch durch Prüfung anderer kultureller Eigenschaften meiner hämolysierenden Coli-Stämme.

Bei Gelatinestrichkulturen zeigten sich die schon von Burk hervorgehobenen Wachstumsunterschiede. Die Mehrzahl der Stämme bildete einen leicht grauen, trockenen, durchscheinenden Belag, der bei bei wenigen Stämmen nach einiger Zeit deutliche Fältelung zeigte. Eine kleine Zahl 16 Proz. aber wuchs in einem üppigen stark feuchtglänzenden, undurchsichtigen Belag, der sich allmählich nach unten senkt (diese Stämme sind in der Tabelle durch ein schwarzes Rechteck in der Rubrik Gelatine gekennzeichnet). Verflüssigung und Farbstoffbildung wurde nicht beobachtet.

Milchgerinnung trat bei den meisten in 48 Stunden, bei 4 erst in 8 Tagen ein.

Die Indolreaktion war bei 8-tägiger Bouillonkultur bei fast allen Stämmen schon nach Schwefelsäurezusatz positiv, womit auch die Nitrit-

Tabelle.

Uebersicht über Kultur- und Vergärungsunterschiede bei den 80 untersuchten hämolysierenden Stämmen.

Die Breite der Rechtecke entspricht der Stärke der Hämolyse, des Wachstums bzw. der Säurebildung (= Rötung); die schwarzen Teile registrieren die Vorgänge in den ersten 24 Stunden, die schraffierten gelten für den 2.—3. Tag.

Σ = Wallbildung um die Kolonie nach längerem Aufenthalte bei Zimmertemperatur.

X = Knopfbildung (Mutation) in den älter gewordenen Kolonien.

Lfd. Nr.	Bezeichnung der Stämme	Blutagar. 3 Stufen der Hämolyse	Gelatine schleim. Wachstum.	Milchbildung 1. 24 Std.	Milchbildung nach 1. 48 Std.	Glycerin.	Erythrit.	Arabinose.	Mannit.	Adonit.	Dulcit.	Isodulzit.	Dextrose.	Gulaktose.	Lävulose.	Mannose.	Maltose.	Laktose.	Sakcharose.	Raffinose.	Dextrin.
I. Kolistämme, die Sakcharose und z.T. Raffinose zerlegten.																					
1	131																				
2	341																				
3	132																				
4	1																				
5	10																				
6	52																				
7	51																				
8	122																				
9	311																				
10	201																				
11	8a																				
12	33																				
13	A 62																				
14	241																				
15	262																				
16	56																				
II. Kolistämme, die Raffinose, nicht Sakcharose zerlegten.																					
17	202																				
18	461																				
III. Kolistämme, die Adonit, nicht Sakcharose und Raffinose zerlegten.																					
19	35																				
20	411																				
21	412																				
22	301																				
23	33																				
24	342																				
25	18																				
26	341																				
27	40																				
28	532																				
29	57																				
30	5																				
31	141																				
32	43																				

Lfd. Nr.	Benennung der Stämme	Butyrag. Stäben der Hämolyse	Gelatine	Schlemm-Wachstum	Malachitgrünagar 1:50000	Malachitgrünagar nach Löffler	Glycerin	Erythrit.	Arabinose.	Mannit.	Adonit.	Dulzit.	Isodulzit.	Dextrose.	Gulaktose.	Lävulose.	Mannose.	Maltose.	Laktose.	Sakharose	Raffinose.	Dextrin.
<i>Iva. Kolistämme, die Sakharose, Raffinose, Adonit und Dulzit nicht zerlegen.</i>																						
33	481																					
34	A1																					
35	A161																					
36	8																					
37	483																					
38	462																					
39	7a																					
40	161																					
41	42																					
42	49																					
43	392																					
44	15																					
45	44																					
46	261																					
47	272																					
48	38																					
49	263																					
50	32																					
51	39																					
52	19																					
53	542																					
54	A10																					
55	11																					
56	A91																					
57	60																					
58	581																					
59	561																					
<i>Ivb. Kolistämme, die Sakharose, Raffinose und Adonit nicht, wohl aber Dulzit zerlegen.</i>																						
60	2a																					
61	2b																					
62	391																					
63	121																					
64	582																					
65	A92																					
66	A151																					
67	301																					
68	302																					
69	242																					
70	43																					
71	37																					
72	271																					
73	42																					
74	63																					
75	A61																					
76	9																					
77	41																					
<i>V. Paratyphus-ähnliche Stämme (Laktose nicht zerlegend).</i>																						
78	312																					
79	482																					
80	471																					

bildung bewiesen war. Bei 3 Stämmen löste erst Nitritzusatz die Reaktion der Rotfärbung aus. Koagulation, Indolreaktion und die geringen morphologischen Unterschiede einzelner Stämme wurden zwecks Differenzierung in die Tabelle nicht mit aufgenommen.

Schon merklichere Unterschiede zeigte das Verhalten auf Malachitgrünagar der in zweierlei Form zur Anwendung kam, als einfacher Malachitgrünagar, dem Malachitgrün in einer Konzentration von 1:50 000 zugesetzt war (wo Typhusbacillen noch gerade wachsen), sowie in der von Löffler angegebenen Zusammensetzung (Deutsche med. Wochenschr. 1907. No. 39). Auf Löfflerschem Malachitgrünagar wuchsen — im Impfstich, wie ich hervorheben möchte — fast alle Stämme, und zwar nach 48 Stunden auch ziemlich kräftig. Auf unserem einfachen Malachit-

grünagar dagegen wuchsen die meisten nicht; deutliches Wachstum zeigten 8, schwächeres 4 Stämme.

Die Säurebildung der Coli-Bakterien aus Kohlehydraten ist von mehreren Forschern schon untersucht und zur Unterscheidung benutzt worden.

Aus der Reihe der Befunde greife ich einige zwecks späteren Vergleichs heraus. Smith stellt auf Grund des verschiedenen Verhaltens gegen Saccharose eine α - und β -Reihe der Coli-Bakterien auf. v. Drigalski und Conradi finden keine Vergärung der Saccharose, ebenso nicht von Dulcit und Dextrin, Capaldi und Proskauer keine Zersetzung von Raffinose und Adonit. Burk bestätigt die Smithsche Unterscheidung der α - und β -Reihe und betont die ziemlich Uebereinstimmung der Vergärung von Raffinose und Saccharose durch seine Stämme.

Ich prüfte sämtliche 80 Stämme auf 16 Kohlehydraten bzw. Alkoholen, darunter 5, die bisher weniger berücksichtigt wurden; Glycerin, Erythrit, Adonit, Dulcit und Mannose. Als Nährboden wählte ich Endoschen Agar, dem die einzelnen zu prüfenden Stoffe im Verhältnis von 1:100 in Substanz zugesetzt wurden. 75 ccm dieser Nährböden wurde in große Schalen von 20 cm Durchmesser ausgegossen, auf denen sich in umschriebenen Quadraten mit Hilfe des Impfstreiches leicht gleichzeitig 56 Stämme prüfen ließen. Säurebildung wird dann durch tiefe Rotfärbung des Nährbodens in und um die Kulturmasse angezeigt.

Die Tabelle verfolgt nicht den Zweck, jeden der Stämme nach seinen kulturellen Eigenschaften zu charakterisieren, sondern nur wesentliche Unterschiede, besonders auch bezüglich der Säurebildung aus verschiedenen Kohlehydraten mit Berücksichtigung der speziellen hämolytischen Wirkungsweise herauszuheben. Aus der Tabelle ergibt sich, daß eine ganze Reihe dieser Kohlehydrate von fast allen Stämmen in gleicher Weise angegriffen wird, andere wie Saccharose, Raffinose, Adonit nur von einem Teil der Stämme. Auf diese Weise ergeben sich ungezungen 3—4 Gruppen.

1) Wie schon Smith und Burk, fand auch ich, daß eine Gruppe (20 Proz. der Stämme umfassend) Saccharose unter Säurebildung zerlegt, in einem Teil der Fälle gleichzeitig noch Raffinose. 2) Eine andere Gruppe (fast 13 Proz.) möchte ich so umschreiben, daß ihre Stämme Saccharose und Raffinose nicht, wohl aber Adonit angreifen. 3) Dazwischen wären 2 Stämme aufzuführen, die Raffinose allein zersetzen ohne Saccharose. 4) Eine größere Gruppe ist endlich dadurch charakterisiert, daß sie Saccharose, Raffinose und Adonit nicht angreift, sondern nur die auch sonst durchweg zersetzten Kohlehydrate. Jede der Gruppen besonders die 4., könnte man, wie die Uebersicht zeigt, wieder teilen, je nach Säurebildung oder Nichtsäurebildung aus Dulcit. Dieser Alkohol, der nach Conradi von Coli-Bakterien nicht angegriffen wird — aus seiner Arbeit ist nicht ersichtlich, wie viele verschiedene Stämme geprüft wurden — wurde von über $\frac{1}{3}$ der Stämme zersetzt, meist allerdings erst am 2. oder 3. Tage und nicht immer vollständig. Das Capaldi und Proskauer keine Zersetzung von Raffinose und Adonit fanden, mag wohl darin seinen Grund haben, daß sie nicht genug Stämme prüften. Auf Erythrit und Dextrin zeigte sich durchweg keine Säurebildung. Um noch auf auffälligere Unterschiede aufmerksam zu machen, sei hingewiesen auf das wechselnde Verhalten gegenüber Isodulcit, sowie darauf, daß Galaktose, sonst regelmäßig zersetzt, von 5 Stämmen überhaupt nicht angegriffen wurde. Auf Laktose bildeten 2 Stämme gar keine Säure, 2 andere nur schwach. Bei den beiden ersten trat Milchgerinnung einmal gar nicht (St. 31,2) im anderen Falle

(A. 9,1) kümmerlich nach 3 Tagen, bei den 2 letzten Stämmen nach 8 Tagen ein (47,1 und 48,2).

Bei den hämolysierenden Stämmen aus demselben Stuhl bestanden außer der Verschiedenheit der Hämolyse auch sonst noch Kulturunterschiede mit Ausnahme von je 2 Stämmen (St. 34,1 und 2; 26,1 und 3).

Wieweit die versuchte Gruppierung für die Coli-Bakterien im allgemeinen Gültigkeit hat, ließe sich nur durch Prüfung einer großen Serie von Coli-Spielarten nachweisen.

Die obige Zusammenstellung beweist nun 1) daß eine Gruppierung der hämolytischen Coli-Bakterien auf Grund der Eigenschaft, den Blutfarbstoff in bestimmter Weise zu verändern, abgesehen von der Veränderlichkeit dieser Eigenschaft, auch deshalb nicht möglich ist, weil nach der Art der Hämolyse zusammengehörende Stämme sich sonst kulturell verschieden verhalten können. 2) Geht aus der Tabelle klar hervor, daß die ganze Gruppe der hämolysierenden Coli-Bakterien nicht einheitlich charakterisiert ist. Es dürfte demnach nicht angebracht sein, „*Bacterium coli haemolyticum*“ als eine umschriebene Art aufzustellen.

Schließlich sei noch auf einige Besonderheiten aufmerksam gemacht. Auf Erythrit- und besonders auf raffinosehaltigen Endo-Agarplatten, die 6–8 Tage bei Zimmertemperatur aufgehoben waren, zeigten sich bei manchen Stämmen auf dem im übrigen weißlichen Impfstrich bei verschiedenen Stämmen kleine, rote knopfartige Erhebungen, die also den von der übrigen Kulturmasse nicht zersetzten Zucker angreifen konnten. Diese von Neisser und Massini als Mutation gedeuteten Vorgänge auf zuckerhaltigen Nährböden, auf deren häufigeres Vorkommen Reiner Müller bei der letzten Tagung der freien Vereinigung für Mikrobiologie zuerst aufmerksam gemacht hat, scheinen danach bei hämolysierenden Coli-Bakterien manchmal auf Erythrit und Raffinose vorzukommen. Einige Stämme zeigten auf bestimmten Zuckerarten auffällige weißlich schleimige Wälle, meist nach 6–8 Tagen bei Zimmertemperatur, wenn eine nachträgliche Alkalibildung eingesetzt hatte.

Ein wichtiges Differenzierungsmittel bliebe noch zu prüfen: Die Pathogenität der hämolysierenden Coli-Bakterien. Es lag nahe anzunehmen, daß gerade diese Stämme für Tiere besonders pathogen seien.

Während Lesage und Macaigne (zitiert nach Escherich) fanden, daß Coli-Stämme aus kranken Därmen virulenter seien als aus gesunden, bestreiten andere dies als allgemeingültig. Kaiser und Blumenthal und Hamm konnten Beziehungen zwischen Virulenz und Hämolysinbildung nicht feststellen. Im allgemeinen scheinen Meerschweinchen von mittlerer Größe (300–400 g) nach intraperitonealer Injektion von 2 ccm 24-stündiger Bouillonkultur von frisch aus dem Darm gezüchteten Stämmen in spätestens 4 Tagen einzugehen.

Ich stellte meine Versuche ebenfalls hauptsächlich mit Bouillonkulturen an, aber von Stämmen, die schon länger auf Gelatine gewachsen waren. Vor jeder Impfung wurden sie nochmals auf ihr hämolytisches Verhalten geprüft.

1. Versuch: 3 Meerschweinchen von etwa 250 g Gewicht impfte ich intraperitoneal mit je 1 Oese einer 24-stündigen Agarkultur von einem Stamm (35) mit Hofbildung, einem zweiten (1), der nur Aufhellung unter der Kolonie zeigte, und von einem dritten Stamm (Burkscher Stamm 265) der nicht hämolytisch wirkte. Die mit Stamm 35 und 265 gespritzten Tiere gingen in ca 15 Stunden ein; das dritte Tier wurde krank, nahm an Gewicht ab, erholte sich aber bald.

2. Versuch: Gleichschwere Meerschweinchen erhielten 1 ccm 24-stündige Bouillonkultur der gleichen Stämme intraperitoneal. Alle wurden krank, nahmen in 3 Tagen bis 60 g an Gewicht ab, erholten sich jedoch nach 10 Tagen.

3. Versuch: Bei Injektion von 2 ccm derselben Stämme ging das Meerschweinchen, das mit einem hofbildenden Coli-Stamm (35) geimpft war, innerhalb 3 $\frac{1}{2}$ Stunden ein. Die beiden anderen Tiere (Stamm 1 und 265) bekamen Durchfall, erkrankten sehr schwer und erholten sich erst ganz allmählich.

4. Versuch: Nun verimpfte ich dieselbe Dosis von anderen Stämmen, wovon 2 Höfe bildeten (Stämme 48, 59) einer nicht hämolytisch wirkte. Die Tiere mit den hofbildenden Stämmen starben nach 4 Stunden, das dritte Tier erst nach 12 Stunden. In derselben Zeit ging ein weiteres mit einem nicht hämolytischen Coli-Stamm geimpftes Tier ein, während ein anderes Meerschweinchen mit einem hofbildenden, aber aus einem gesunden Darm stammenden Coli-Stamm wieder nach 4 Stunden starb.

Sektionsergebnisse: Bei den mit hofbildenden Coli-Stämmen geimpften nach etwa 4 Stunden verendeten Tieren zeigten sich makroskopisch keine besonderen Veränderungen der inneren Organe, höchstens geringe Trübung eines mäßigen Exsudats in der Bauchhöhle und Injektion der Gefäße des Peritoneums. Es mußte hier also wesentlich das schon in den Kulturen entstandene Toxin zum Tode geführt haben. Bei den übrigen intraperitoneal gespritzten Tieren fand sich als wesentlicher Befund ein stark getrübbtes Bauchexsudat, starke Injektion der Gefäße und eitrig fibrinöse Beläge auf Leber und Milz und zwischen den Darmschlingen. Die Milz war kaum vergrößert, ohne septisches Aussehen. Bei allen Tieren wurden aus Herzblut, Milz und Peritonealexsudat wieder Coli-Bakterien gezüchtet, die mit absoluter Regelmäßigkeit genau dasselbe Verhalten auf Blutagar zeigten, wie die angewandten Stämme. Bei 2 Meerschweinchen entstanden nach subkutaner Injektion von 1,5 und von 2 ccm Bouillonkultur tiefgehende Infiltrationen und Abscesse.

Wir kämen also zu dem Schlusse, daß die Virulenz der hämolytischen Coli-Bakterien nicht wesentlich größer ist, als die der nichthämolytischen und als die auch sonst gefundene. Wir können aus den Versuchen, in denen zur Impfung nichthämolytische Stämme benutzt wurden, noch folgern, daß es nicht gelingt, durch Tierpassage solchen Stämmen die Eigenschaft zu geben, auf Blutagar hämolytisch zu wirken. Mit obigen Versuchen ist natürlich nicht bewiesen, daß hämolytische Coli-Bakterien auch für den Menschen nicht virulenter sind als andere.

Eine andere Frage ist die, ob sich aus dem natürlichen Gemisch der Coli-Bakterien, wie es im Kote vorkommt, durch Tierpassage eine Anreicherung der hämolytischen erzielen läßt.

Dazu impfte ich Meerschweinchen intraperitoneal mit verschiedenen Stuhlproben, indem ich zuerst 1 Oese Faeces in 5 ccm physiologischer Kochsalzlösung verrieb und davon 1 ccm interperitoneal injizierte. Gleichzeitig wurde von dieser Faecesaufschwemmung eine Aussaat auf Blutagar gemacht. Die erste Dosis wurde von allen Tieren gut vertragen. Desgleichen eine Injektion von 2 ccm einer Aufschwemmung von 1 Oese Faeces in 2,5 ccm NaCl. 5 Oesen Faeces, in 3 ccm aufgeschwemmt, töteten 3 Meerschweinchen nach Verlauf von 18 bis 24 Stunden. Wie die direkte Aussaat der Faeces auf Blutagar im ersten Falle nur 4 Kolonien mit Aufhellung im Bereich der Kolonie ergab, so wuchsen aus Herzblut und Peritonealexsudat der geimpften Tiere nur nichthämolytische, aus der Milz außerdem noch 2 kleine durchscheinende Kolonien. Im zweiten Falle wurden aus dem Tierkörper hämolytische und nichthämolytische Coli-Stämme in demselben Verhältnis gezüchtet, wie sie auf der mit den entsprechenden Faeces beimpften Platte nachgewiesen wurden. Nur im dritten Falle wuchsen aus der Peritonealflüssigkeit mehr hämolytische Kolonien, als in den Faeces gefunden wurden. Merkwürdigerweise blieb hier die Aussaat des Herzblutes steril.

Es ergibt sich also, daß durch Tierpassage eine deutliche Anreicherung der hämolytischen Coli-Stämme sich nicht erreichen läßt.

Paratyphusähnliche Darmbakterien mit Hämolyse: Kurz möchte ich noch die Befunde von einigen anderen Darmbakterien berühren, die auf Ziegenblutagar den Blutfarbstoff zerstören. Zunächst

3 Stämme (31,2, 47, 48,2) die das gemeinsam hatten, daß sie auf Lackmus-Laktoseagar in flachen Kolonien bläulich durchscheinend wuchsen, sonst alle Eigenschaften der Coli-Bakterien besaßen, aber Milch sehr spät koagulierten. Daß es sich nicht um Paratyphusbakterien handelte, bewies vor allem der negative Ausfall der Agglutination. Stamm 31,2 wuchs auf Blutagar in klar durchscheinenden Kolonien mit schmalem Hof. Die Stämme 47 und 48 zerstörten den Blutfarbstoff, wie die zur Gruppe III gehörigen Coli-Bakterien nur unter der Kolonie. Man hat sich seit einigen Jahren gewöhnt, derartige Bakterien, die also auf dem v. Drigalski-Conradischen Agar blau, auf Endoschem Nährboden farblos wachsen, nicht als Coli-Bakterien zu bezeichnen. H. Gräf war der erste, der über das Vorkommen solcher Bakterien, die er als „paratyphusähnliche“ bezeichnete, systematische Untersuchungen mit vielen Stämmen aus menschlichen Stuhlaussaaten anstellte. Er konnte, was bei den eigentlichen Coli-Bakterien noch nie gelungen ist, bei seinen Stämmen scharf morphologisch, kulturell und serologisch unterscheidbare Arten aufstellen. Die hämolysierende Wirkung hat Gräf nicht geprüft. Reiner Müller hat nun (nach einer persönlichen Mitteilung) bei anderweitigen Untersuchungen die noch vorhandenen, 2 Jahre auf Gelatine fortgezüchteten, Gräfschen paratyphusähnlichen Darmbakterien auf Blutagar geprüft. Die Gruppe II (2 Stämme) und die Gruppe XII (1 Stamm) machten eine geringe Zerstörung des Hämoglobins, nur Saumbildung um die Kolonien. Aber die 6 Stämme der Gruppe VIII, bei der Gräf eine Pathogenität vermutete, wuchsen mit klarem breiten Hofe. Weiterhin prüfte Müller eine große Zahl anderer hierhin gehörigen Darmbakterien auf Blutagar: Typhusbakterien, Paratyphusbakterien der verschiedensten Typen, Enteritis, Mäusetyphus, Schweineseuche, Schweinepest, Kälberruhr, Dysenterie, Pseudodysenterie; und er fand fast nirgends Hämolyse auf Blutagar. Nur unter den Enteritisbakterien fanden sich 2 Stämme mit Hofbildung auf Blutagar, nämlich die von B. Fischer beschriebenen Stämme Haustedt und Rumfleth.

Hämolysierende Darmkokken: Mit fast absoluter Regelmäßigkeit in den Stühlen Gesunder, aber auch in Faeces aus krankem Darm fanden sich kleine, meist nach 24 Stunden noch nicht stecknadelkopfgroße fast farblose Kolonien, die bei der Durchsicht nach 24 Stunden ein schwärzliches punktförmiges Zentrum zeigten, umgeben von einem grünlich-gelben Saum. Nach 48 Stunden waren die Kolonien etwas größer und zeigten eine grünlich-gelbe Verfärbung des Nährbodens, soweit die Kolonie reichte. Es handelte sich um grampositive, vielfach etwas oval geformte Diplokokken, die auf Blutagar weniger, in Bouillon aber fast immer Ketten von etwa 8—10, seltener mehr Gliedern bildeten. Auf Gelatine bilden sie einen zarten, anfangs hauchartigen Belag, ähnlich auf Agar; sie wachsen auf v. Drigalskischem Nährboden kaum, bilden im Neutralrot-Traubenzuckeragar kein Gas und keine Verfärbung, koagulieren Milch in 24 Stunden, bilden kein Indol, wachsen im Gelatinestich leicht körnig und zeigen hier nach einigen Tagen eine bräunlich-gelbe Färbung. Nach 3 Monate langem Wachstum auf Gelatine lebten sie noch. Mehrere Mäuse, mit einer Oese dieser Kokken subkutan geimpft, starben nicht, während eine gleichzeitig mit Pneumokokken geimpfte Maus in 24 Stunden einging. Danach scheint dieser Streptococcus nach allen seinen Eigenschaften und besonders nach seinem Verhalten auf Blutagar dem Schottmüllerschen Streptococcus mitior sehr nahe zu stehen.

Fluoreszierende Darmbakterien mit Hämolyse: Mehrere Male fand ich gelblich durchscheinende mittelgroße Kolonien mit breiter Hofbildung von gramnegativen geraden Stäbchen, die einen blaugrünen Farbstoff, besonders auf Agar entwickelten, Gelatine verflüssigten und den typischen für *Bact. pyocyaneum* charakteristischen Geruch hatten. Während ich verschiedentlich dieses *Bact. pyocyaneum* aus dem Darm züchtete, immer mit breiter Hofbildung auf Blutagar, fand ich einmal ein *Bact. fluorescens non liquefaciens*, daß den Blutfarbstoff gar nicht veränderte. Vielleicht ergäbe sich auf diese Weise durch das Verhalten auf Blutagar ein schärferer Unterschied zwischen *Bact. pyocyaneum* und *fluorescens*.

Ein nicht genauer klassifizierbares hämolysierendes Stäbchen: Schließlich möchte ich noch ein kurzes, anfangs gramnegatives, später sich nach Gram nicht mehr so stark entfärbendes Stäbchen, erwähnen, daß sich dadurch auszeichnet, daß die flachen stecknadelkopfgroßen Kolonien auf Blutagar schon innerhalb 24 Stunden grünlich erscheinen und sehr deutlich bei der Durchsicht von einem ziemlich breiten schwarz-grünen Hof umgeben sind. Auf Gelatine wachsen diese Stäbchen in einem ganz zarten Belag, auf v. Drigalskischem Nährboden ganz kümmerlich, koagulieren Milch nicht, bilden kein Indol und in Neutralrottraubenzuckeragar kein Gas und keine Verfärbung.

Ueber Colisepsis: Zum Schluß möchte ich noch kurz auf die schon mehrfach erwähnte, wahrscheinliche Coli-Sepsis eingehen. Es wurden aus dem Blute einer typhusverdächtigen Frau (deren Mann später an Typhus erkrankte und bei dem die klinische Diagnose durch die Agglutination bestätigt wurde) in Reinkultur gramnegative Stäbchen gezüchtet, die alle Eigenschaften der Coli-Bakterien besaßen. Dieser aus dem Blute gezüchtete Stamm wurde durch das eigene Serum der Patientin in einer Verdünnung von 1:75 agglutiniert, durch Serum eines Typhuskranken und durch Normalserum gar nicht. Ein zweimaliger Agglutinations- und Züchtungsversuch mit dem Blute der Frau gab keinen Anhalt für das Bestehen einer Typhusinfektion. Immerhin sind Zweifel berechtigt, ob es sich in dem vorliegenden Falle um eine reine Coli-Sepsis und um den eigentlichen Krankheitserreger handelt. Denn 1) gibt es Coli-Stämme, die durch das eine oder andere Serum agglutiniert werden (vergl. Burk), 2) erkrankte später der Ehemann an bakteriologisch nachgewiesenem Typhus. Was aber die Häufigkeit der Coli-Bakteriämie anlangt, so ist es im Kieler Untersuchungsamte aufgefallen, daß in den letzten 3 Jahren von über 1000 kulturell untersuchten Blutproben nur 4mal Kolonien gefunden wurden, die auf Lackmus-Laktose-Agar rot wuchsen, obwohl doch von vornherein anzunehmen ist, daß Aerzte bei klinisch so unklaren Fällen, wie Coli-Infektionen, sicher Blutproben zur bakteriologischen Untersuchung eingeschickt haben würden.

Zusammenfassung.

1. Coli-Kolonien mit Zerstörung des Blutfarbstoffes auf Ziegenblutagarplatten finden sich in der Mehrzahl der Stühle, und zwar annähernd gleich oft im kranken wie im gesunden Darm.

2. Es finden sich (auch in demselben Darne) verschiedene Stufenfolgen derartiger Kolonien

- a) solche mit klar durchsichtigem Hof,
- b) solche mit weniger durchscheinendem Saum. Bei beiden ist auch der Blutfarbstoff unter der Kolonie entsprechend zerstört,

- c) solche bei denen der Blutfarbstoff nur unter der Kolonie mehr oder weniger zerstört ist.

Diese Typen lassen sich auf Blutagarplatten von nichthämolytischen Coli-Kolonien gut unterscheiden.

3. Manche hämolysierenden Coli-Stämme verlieren diese Eigenschaft nach längerer Zeit ganz, bei manchen verringert sie sich.

4. Die ganze Gruppe der hämolytischen Coli-Bakterien wie auch die 3 verschiedenen Stufen sind nach anderen kulturellen Eigenschaften, besonders bezüglich der Säurebildung aus Kohlehydraten nicht einheitlich charakterisiert. Eine fest umschriebene Art „Coli haemolyticum“ läßt sich nicht aufstellen.

5. Die hämolytischen Coli-Bakterien sind für Meerschweinchen kaum virulenter als nichthämolytische.

6. Passage durch den Tierkörper ändert das hämolytische Verhalten nicht.

7. Durch Injektion von Faeces in die Peritonealhöhle von Meerschweinchen läßt sich keine Anreicherung der hämolytischen Coli-Bakterien erzielen.

8. Außer Coli- fanden sich im Darm noch andere blutfarbstoffverändernde Bakterien: 1) zur Pyocyaneus- und Fluorescens-Gruppe gehörige; 2) auf Lackmus-Laktose-Agar blau wachsende (paratyphusähnliche); 3) Streptococcus mitior; 4) ein nicht näher klassifiziertes gramnegatives Stäbchen.

Es ist mir eine angenehme Pflicht, Herrn Geheimrat B. Fischer für das gütige Interesse an meinen Untersuchungen und Herrn Privatdozenten Dr. Reiner Müller für die Anregung zu dieser Arbeit und lebenswürdige Unterstützung bestens zu danken.

Literatur.

- Blumenthal und Hamm, Mitteil. a. d. Grenzgebiet. d. Mediz. etc. Bd. 18. 1908. Heft 4.
Burk, Centralbl. f. Bakteriologie. Abt. I. Orig. Bd. XLV. 1907. Heft 7.
Capaldi und Proskauer, Zeitschr. f. Hyg. 1896. p. 452.
Escherich und Pfaundler: in Kolle-Wassermanns Handbuch d. pathog. Mikroorg. Bd. II. 1903. p. 334.
Gräf, H., Zeitschr. f. Hyg. Bd. LIV. 1906. p. 20.
Kaiser, Zeitschr. f. Hyg. Bd. XLII. 1903. p. 118.
Mandelbaum, Münch. med. Wochenschr. 1907. No. 36.
Much und Schottmüller, Münch. med. Wochenschr. 1908. No. 10.
Müller, Reiner, Centralbl. f. Bakteriologie. Abt. I. Referate. Bd. XLII. 1908. Beiheft. p. 57.
Pribram in Kolle-Wassermanns Handb. d. pathog. Mikroorg. 1. Erg. Bd. p. 291.
Radziewsky, Zeitschr. f. Hyg. Bd. XXXIV. 1900. p. 369.
Schottmüller, Münch. med. Wochenschr. 1903. No. 20 u. 21.
Smith, N. Lee, Centralbl. f. Bakteriologie. Bd. XXV. 1902. p. 689.
Smith, Th., Centralbl. f. Bakteriologie. Bd. VIII. 1890. p. 389.
—, Centralbl. Referate. Bd. XIV. 1893. p. 864.
Stövesandt, K., Centralbl. f. Bakteriologie. Abt. I. Orig. Bd. XLVI. 1908. Heft 4.
Totsuka, Zeitschr. f. Hyg. Bd. XLV. 1903. p. 115.
Wolff, Centralbl. f. Bakteriologie. Abt. I. Orig. Bd. XXXIII. 1903. p. 645.

Nachdruck verboten.

Ueber Anaphylaxie durch Fütterung gegenüber Fütterung.

[Aus der Universitäts-Augenklinik zu Straßburg
(Direktor: Prof. Schirmer).]

Von Dr. **Felix Börnstein**, Assistenten der Klinik.

Nachdem Römer auf dem Heidelberger Ophthalmologenkongreß von 1908 von Erfolgen seiner Linsenverfütterung bei der Therapie der Cataracta senilis subcapsulata berichtet hatte, wurden an unserer Klinik Untersuchungen darüber angestellt, wie sich das intern gegebene Linseneiweiß überhaupt als Antigen verhält, ob und wieviel es durch die Verdauung an seiner antigenen Wirksamkeit einbüßt. Diese Frage war um so mehr von Berechtigung und Wichtigkeit, als die Theorie den Vorgang der Starbeeinflussung zunächst als eine Art Immunisierung, als eine Bindung der spezifischen Linsengiftstoffe im Serum durch das eingeführte Linseneiweiß für möglich erklärt hatte. Sie wurde von R. Wissmann physiologisch-chemisch, von mir biologisch untersucht. Ich hatte das Ergebnis, daß bei den herbivoren Kaninchen ein Uebergang des verfütterten Linseneiweißes im Blute konstant nachweisbar war, während die Untersuchungen bei Katzen und bei mir selbst (ich aß über 11 Wochen täglich 1 Rinderlinse) stets negativ blieben. Die Originalversuche werden an anderer Stelle im Zusammenhang mitgeteilt. Hier möchte ich nur auf einen Befund näher eingehen, den ich bei der Fütterung von Kaninchen mit Linseneiweiß beobachtete, und dessen Bedeutung für die Immunitätslehre wie für die praktisch-klinische Therapie beachtenswert erscheint. Es handelt sich um das Vorkommen einer Ueberempfindlichkeit, die durch stomachale Einführung eines artfremden Eiweißkörpers hervorgerufen, durch erneute interne Dosis desselben Antigens die stürmischste Reaktion, den Exitus zur Folge hatte.

Daß durch Injektion eines artfremden Eiweißes, mag diese nun intraperitoneal, subkutan, intravenös oder intracerebral geschehen, eine spezifische Ueberempfindlichkeit entstehen kann, ist durch zahllose Untersuchungen, im einzelnen auch für Toxalbumine, Fermente, Sera, Zellen, Mikroben und deren Derivate bewiesen worden. Es handelte sich um eine meist einmalige Injektion und um die Auslösung von Shock etc. durch die Wiederholung der Injektion nach einer Inkubationszeit von 12—20 Tagen. Wurde die zweite Injektion vor dem 10. Tage gegeben, ertrug das Versuchstier sie anstandslos.

Auf die Theorien der Anaphylaxie einzugehen, ist hier nicht der Ort, es gibt fast so viele, wie Autoren. Das eine wird aber allgemein angenommen, daß in dem eingeführten artfremden Eiweiß ein ganz spezifisches, den anaphylaktischen Reaktionskörper auslösendes Antigen enthalten sein muß. Ueber seine Natur ist ein abschließendes Urteil noch nicht gefällt.

Daß das Linseneiweiß wie jedes artfremde Eiweiß die Anaphylaxieerscheinungen auslöst, geht aus den Arbeiten von Kraus, Dörr und Sohma (Wien. med. Wochenschr. 1908) hervor. Die Autoren haben Meerschweinchen mit einer subkutanen Injektion von Linseneiweiß vorbehandelt und durch intravenöse Injektion nach etwa 3 Wochen die Anaphylaxie demonstriert. Die Tiere gingen sofort oder nach kurzer

Zeit zugrunde. Auch die passive Anaphylaxierung durch Injektion des Serums überempfindlicher Tiere ist analog den bekannten Versuchen mit anderen Eiweißkörpern gelungen.

Die ersten Mitteilungen über Anaphylaxie, die durch Eiweißfütterung hervorgerufen war, stammen von Rosenow und Andersson (Hyg. Laboratory Bulletin. 1906. No. 29): Es wurde im Meer-schweinchen durch Fütterung mit Pferdeserum und Pferdefleisch eine Ueberempfindlichkeit gegenüber diesen Eiweißkörpern erzeugt, welche sich durch einen sofortigen, typischen Exitus nach einer sonst anstandslos ertragenen Injektion dartat. Wieweit diese Verhältnisse des Tierversuches auf das Verhalten des menschlichen Organismus Bezug haben, ist noch nicht untersucht worden. Ob durch Eiweißfütterung nun auch eine Ueberempfindlichkeit gegen nachheriges, erneutes Füttern entstehen kann, ist eine Frage, die von Rosenow und Andersson auch aufgeworfen, doch noch nicht beantwortet worden ist.

An dieser Stelle möchte ich nun mit der Mitteilung meiner Versuche einsetzen, indem ich zunächst tabellarisch über sie referiere. Die Fütterung geschah durch einen Gummikatheter (etwa No. 12—13), der in den Magen der Tiere per os eingeführt wurde.

Von den 32 gefütterten Tieren sind 2 in der 1., 6 in der 2.—4. und 21 in der 5.—16. Woche gestorben, 3 leben noch. Unter den 21 Tieren der 5.—16. Woche sind an Anaphylaxie zugrunde gegangen mit Bestimmtheit 6, mit größter Wahrscheinlichkeit 2, deren Exitus nicht beobachtet wurde. Bei diesen 8 Tieren hatte ich folgenden Befund (s. Tabellen p. 375—377).

Es müßte ein geradezu sonderbarer Zufall obwalten, wenn die Tiere zum Teil sehr schnell nach einer Fütterung zugrunde gingen, die sie zuvor bis über 100mal anstandslos aushielten, ohne daß eben als Ursache die Anaphylaxie anzunehmen sei. Der gute Ernährungszustand, das Fehlen eines Zusammenhanges mit dem mechanischen Fütterungsakt, das Fehlen von deutlichen Organerkrankungen, das typische Auftreten der Krämpfe und der Atemlähmung und das lange Nachdauern der Pulsation dürften einen ausreichenden Beweis für die Ueberempfindlichkeit als Causa exitus darbieten.

Untersuchungen über die Frage, unter welchen Bedingungen die Anaphylaxierung von Kaninchen durch Linsenfütterung gegenüber einer nachfolgenden Injektion möglich ist, Versuche, die denen von Rosenow und Andersson analog wären, sind von mir begonnen worden, konnten

Kaninchen 1.

Tägliche Dosis	Zeit	Präzipitine
$\frac{1}{2}$ Rinderlinse	nach 10 Tg.	0
$\frac{1}{2}$ "	" 20 "	0
$\frac{1}{2}$ "	" 34 "	0
1 "	" 40 "	0
1 "	" 46 "	++
1 "	" 59 "	++
1 "	" 65 "	Exitus

ca. 10 Minuten nach Beginn der Fütterung, kurze Zuckungen, Atemlähmung; Pulsation etwa 5 Minuten länger. Guter Ernährungszustand.

Anfangsgewicht: 2,815 kg.

Schlußgewicht: 3,245 kg.

Kaninchen 2.

Tägliche Dosis	Zeit	Präzipitine
$\frac{1}{2}$ Rinderlinse	nach 10 Tg.	0
$\frac{1}{2}$ "	" 25 "	0?
$\frac{1}{2}$ "	" 37 "	?
1 "	" 49 "	+
1 "	" 59 "	++
1 "	" 71 "	Exitus

5—10 Stunden nach der letzten Fütterung; nicht beobachtet.

Autopsie mit völlig negativem Befund. Lungen und Magen intakt. Ernährungszustand gut.

Anfangsgewicht: 3,02 kg.

Schlußgewicht: 3,03 kg.

Kaninchen 3.

Tägliche Dosis	Zeit	Präzipitine
$\frac{1}{2}$ Rinderlinse	nach 10 Tg.	0
$\frac{1}{2}$ "	" 20 "	0
$\frac{1}{2}$ "	" 30 "	0
2 "	" 37 "	0
2 "	" 44 "	0
2 "	" 52 "	+
2 "	" 60 "	++
2 "	" 71 "	++
2 "	" 81 "	Exitus

5—10 Stunden nach der letzten Fütterung;
nicht beobachtet.

Autopsie mit völlig negativem Befund.
Lungen und Magen intakt. Ernährungszustand gut.

Anfangsgewicht: 2,025 kg.

Schlußgewicht: 2,61 kg.

Kaninchen 4.

Tägliche Dosis	Zeit	Präzipitine
$\frac{1}{2}$ Rinderlinse	nach 10 Tg.	0
$\frac{1}{2}$ "	" 20 "	0
$\frac{1}{2}$ "	" 30 "	0
1 "	" 40 "	0
1 "	" 46 "	0
1 "	" 54 "	?
1 "	" 62 "	?
1 "	" 68 "	?
1 "	" 74 "	?
1 "	" 81 "	++
1 "	" 90 "	++
1 "	" 113 "	Exitus

etwa 10 Minuten nach Beginn der Fütterung, Zuckungen, Atemnot, Aufhören der Atmung, Pulsation dauerte noch etwa 5 Minuten fort.

Sektionsbefund negativ: Lungen völlig frei, Magen unverletzt.

Anfangsgewicht: 1,985 kg.

Schlußgewicht: 2,701 kg.

Kaninchen 5.

Tägliche Dosis	Zeit	Präzipitine
$\frac{1}{10}$ L.	nach 10 Tg.	0
$\frac{1}{10}$ "	" 23 "	0
$\frac{1}{10}$ "	" 30 "	?
$\frac{1}{10}$ "	" 35 "	Exitus

fast 10 Minuten nach der Fütterung. Guter Ernährungszustand. Sektionsbefund negativ. Lungen und Magen frei.

Anfangsgewicht: 1,95 kg.

Schlußgewicht: 2,2 kg.

Kaninchen 6.

Tägliche Dosis	Zeit	Präzipitine
$\frac{1}{10}$ L.	nach 10 Tg.	0
$\frac{1}{10}$ "	" 25 "	0
$\frac{1}{10}$ "	" 30 "	0
$\frac{1}{10}$ "	" 38 "	Exitus

3 Stunden nach der Fütterung in gutem Ernährungszustand unter langen Zuckungen.

Sektionsbefund negativ. Lungen und Magen intakt.

Anfangsgewicht: 2,1 kg.

Kaninchen 7.

Tägliche Dosis	Zeit	Präzipitine
$\frac{1}{10}$ L.	nach 10 Tg.	0
$\frac{1}{10}$ "	" 25 "	0
$\frac{1}{10}$ "	" 30 "	vielleicht Spur
$\frac{1}{10}$ "	" 35 "	Exitus

$1\frac{1}{2}$ —2 Stunden nach der letzten Fütterung, Zuckungen, die etwa $\frac{1}{4}$ Stunde anhielten. Sektionsbefund völlig negativ. Lungen und Magen unverletzt.

Anfangsgewicht: 1,83 kg.

Schlußgewicht: 2,18 kg.

Kaninchen 8.

Tägliche Dosis	Zeit	Präzipitine
$\frac{1}{10}$ L.	nach 9 Tg.	0
$\frac{1}{10}$ "	" 18 "	0
$\frac{1}{10}$ "	" 27 "	0
$\frac{1}{10}$ "	" 35 "	0
$\frac{1}{10}$ "	" 41 "	0
$\frac{1}{10}$ "	" 46 "	+ schwach
$\frac{1}{10}$ "	" 62 "	++
5 "	" 63 "	
3 "	" 64 "	
2 "	" 65 "	Exitus

10 Minuten nach Beginn der Fütterung. Lange großschlägige Krämpfe, Aufhören der Atmung 5 Minuten früher als der Pulsation. Sektionsbefund negativ, Lungen und Magen intakt.

Uebersicht.

Kaninchen 1. Exitus nach 9 Wochen (gef. Dosis 48 L.) Präzipitine nach 6 $\frac{1}{2}$ Wochen (gef. Dosis 29 L.)	Kaninchen 2. Exitus nach 10 Wochen (gef. Dosis 52 L.) Präzipitine nach 7 Wochen (gef. Dosis 30 L.)	Kaninchen 3. Exitus nach 11 $\frac{1}{2}$ Wochen (gef. Dosis 117 L.) Präzipitine nach 7 Wochen (gef. Dosis 59 L.)	Kaninchen 4. Exitus nach 16 Wochen (gef. Dosis ca. 100 L.) Präzipitine nach 11 $\frac{1}{2}$ Wochen (gef. Dosis ca. 70 L.)
Kaninchen 5. Exitus nach 5 Wochen (gef. Dosis 3 $\frac{1}{2}$ L.) Präzipitine 0	Kaninchen 6. Exitus nach 5 $\frac{1}{2}$ Wochen (gef. Dosis 3 $\frac{4}{5}$ L.) Präzipitine 0	Kaninchen 7. Exitus nach 5 Wochen (gef. Dosis 3 $\frac{1}{2}$ L.) Präzipitine 0	Kaninchen 8. Exitus nach 9 Wochen (gef. Dosis ca. 16 L.) Präzipitine nach 6 $\frac{1}{2}$ Wochen (gef. Dosis 4 $\frac{1}{2}$ L.)

jedoch aus äußeren Gründen noch nicht zu Ende geführt werden. Wenn auch anzunehmen ist, daß sich das Kaninchen gegenüber dem Linsen-eiweiß ebenso verhalten wird wie das Meerschweinchen gegenüber dem Pferdeserum, so wäre diese Versuchsreihe zum exakten Nachweis einer durch Linsenverfütterung entstehenden Ueberempfindlichkeit notwendig. Für die Anaphylaxie gegenüber der Fütterung wäre sie allerdings ohne Belang und von einer viel größeren Tragweite erscheinen mir die Konsequenzen, die aus der oben stehenden Fütterungsreihe gezogen werden müssen und zusammenhängend in folgende Sätze gefaßt werden können:

- 1) Es gelingt durch tägliche Fütterung von Kaninchen mit Linsen-substanz, eine Ueberempfindlichkeit gegen dieses Eiweiß zu erzeugen.
- 2) Diese Ueberempfindlichkeit hat nach einer Inkubationszeit von ca. 9—16 Wochen und täglicher Dosis von ca. 1 Rinderlinse den Tod durch typischen anaphylaktischen Shock im schnellen Anschluß an die letzte Fütterung zur Folge gehabt.
- 3) Analog den entsprechenden Verhältnissen bei der Injektion hat auch bei der Fütterung die kleinere Dosis eine schnellere Anaphylaxierung als die größere hervorgerufen. Der Exitus erfolgte bei der täglichen Dosis von $\frac{1}{10}$ Rinderlinse schon nach ca. 5 Wochen.
- 4) Völlig unabhängig ist das Auftreten der Anaphylaxie von dem der spezifischen Präzipitine gewesen.

Ob diese Ergebnisse für die Nahrungsphysiologie des Menschen Bedeutung gewinnen, ist nicht vorauszusehen. Vielleicht gibt der Befund für die Forschung nach der Aetiologie jener Erkrankungen eine Anregung, die wir mit dem Sammelnamen der Urtikarien belegen.

Jedenfalls muß die Art der Anaphylaxierung, die nicht durch eine einmalige Injektion, sondern durch dauernde tägliche Oraldosis vor sich ging, und die Auslösung stürmischer Erscheinungen nach längerer oder kürzerer Inkubationszeit durch die gleichartige Einführung des Eiweiß-körpers die Harmlosigkeit der Dauerdosis von Organsubstanzen, die wir zu assimilieren nicht gewöhnt sind, zweifellos in Frage stellen.

An dieser Stelle möchte ich Herrn Prof. E. Levy für das meinen Versuchen entgegengebrachte lebenswürdige Interesse meinen ergebensten Dank aussprechen.

Nachdruck verboten.

Ueber die Abtötung der Tuberkelbacillen in natürlich infizierter Milch und über die Pasteurisierung der Milch

[Aus dem Bakteriologisch-Hygienischen Laboratorium von Privatdozent Dr. Fritz Basenau in Amsterdam.]

Von Y. van der Sluis,

stellvertretendem Direktor am Schlachtviehhof in Amsterdam.

Schon vor der Entdeckung des Tuberkelbacillus durch R. Koch im Jahre 1882 betrachtete man die Tuberkulose der verschiedenen Säugetiere als eine, wenn auch nicht vollkommen identische, dann doch sehr nahe verwandte Krankheit.

Als es Klebs¹⁾ und Bollinger²⁾ gelang, mit tuberkulösem Material vom Menschen beim Rinde ein Krankheitsbild hervorzurufen, das der Perlsucht des Rindes vollkommen glich, und als man zugleich diese Krankheit durch Impfung vom Rinde auf andere Haustiere, wie Pferd, Schwein, Hund und Katze, übertragen konnte, war man von deren Identität überzeugt. Gestärkt wurde man noch in dieser Ueberzeugung, als es R. Koch gelang, bei den verschiedenen Säugetieren einen Bacillus nachzuweisen, der weder morphologisch noch in Kulturen wesentliche Unterschiede zeigte.

Obwohl bereits Pütz im Jahre 1882 die Identität der Rindertuberkulose und der Menschentuberkulose bezweifelte, da es ihm weder durch Fütterung noch durch subkutane oder intrapulmonale Impfungen gelang, Kälber mit Material, das von Menschen herrührte, tuberkulös zu machen, haben spätere Forscher negative Resultate entweder einer zufälligen geringeren Virulenz der Bacillen oder der verschiedenen Empfänglichkeit der verschiedenen Tierarten zugeschrieben.

Th. Smith³⁾ konstatierte bereits Unterschiede in morphologischen Eigenschaften und Kulturen und wies zugleich auf die Tatsache hin, daß der Bacillus der Rindertuberkulose viel virulenter ist als der des Menschen, und obgleich er annahm, daß der Mensch wenig empfänglich sei für eine Infektion von seiten des Rindertuberkelbacillus, so stellte er doch eine mögliche Infektion von seiten des Rindes durch infizierte Milch nicht in Abrede.

Auf dem zu London 1901 abgehaltenen Kongreß erklärte R. Koch, daß die Bacillen des Menschen und des Rindes nicht identisch seien, und daß das Rind durch Tuberkelbacillen, die von Menschen herrührten, nicht zu infizieren sei. Maßregeln also zur Verhütung der Infektion des Rindes auf den Menschen seien nicht mehr nötig. „Den Umfang der Infektion durch Milch, Butter und Fleisch tuberkulöser Tiere“ schätze er „kaum größer als denjenigen durch Vererbung“.

Diese Aufsehen erregende Erklärung Kochs war gegründet auf Versuche, welche er in Gemeinschaft mit Schütz gemacht hatte. Unter anderem zeigten 19 Kälber, welche auf verschiedene Weise mit Tuberkel-

1) Klebs, 1869.

2) Bollinger, 1879.

3) Th. Smith, 1869.

bacillen des Menschen infiziert wurden, bei der Sektion keine Abweichungen, während Kälber, die mit Tuberkelbacillen des Rindes geimpft worden waren, sich bei der Sektion alle als an Tuberkulose leidend erwiesen. Die vielen Versuche, welche von verschiedenen Forschern nach dieser Zeit ausgeführt wurden, bestätigten im allgemeinen zwar, daß das Rind weniger empfänglich ist für Menschentuberkulose als für Rindertuberkulose, doch wurde auch von Fällen berichtet, in denen man bei Rindern nach Infektion mit dem Bacillus der menschlichen Tuberkulose ausgedehnte Tuberkulose erhalten hatte.

So sah Schottelius¹⁾ bei einem mit tuberkulösem menschlichen Sputum gefütterten Rinde eine tuberkulöse Pneumonie, Pleuritis und eine tuberkulöse Darmentzündung mit Entzündung der Lymphdrüsen des Mesenteriums auftreten.

M'Lauchlan Young und Hamilton fütterten 5 Kälber in gleicher Weise und konnten bei dreien von ihnen das Auftreten von Tuberkulose der Halslymphdrüsen und der Drüsen des Gekröses wahrnehmen.

Wolff²⁾ sah bei einem Kalb typische Perlsucht auftreten, nachdem er das Tier subkutan mit menschlichem Tuberkulosevirus geimpft hatte. Fibiger und Jensen³⁾ konstatierten nach einer gleichen Infektion allgemeine Tuberkulose bei 2 Kälbern, während Hamilton und M'Lauchlan Young bei 7 von 9 Kälbern ausgedehnte Tuberkulosis wahrnahmen, u. a. bei 3 Kälbern auch in den Lungen und bei einem in der Milz.

Stuurman⁴⁾ impfte ein Kalb mit einer vom Menschen herrührenden Tuberkelbacillenkultur; das Tier verendete nach 56 Tagen an allgemeiner Tuberkulose. Damman und Eber⁵⁾ erzielten ebenfalls positive Resultate. Andere Forscher impften intraperitoneal und es erhielten auf diesem Wege positive Resultate u. a. Prettnner⁶⁾, Ravenel⁷⁾ und Orth⁸⁾. Die Kälber, welche hierbei als Versuchstiere dienten, gingen nach 46, 21, 27 und 26 Tagen ein.

Eber sah ebenfalls Perlsucht des Peritoneums und der Pleura auftreten.

Nach intravenöser Impfung erzielten de Jong, Ravenel und Prettnner positive Resultate.

Durch Inhalation vermochten Hamilton und M'Lauchlan die Krankheit hervorzurufen, und bei 2 Kälbern sahen sie eine ausgedehnte Pleura- und Lungentuberkulose auftreten.

Stuurman⁴⁾ gelang es, ein Kalb nach intrapulmonaler Impfung zu infizieren und nach 31 Tagen verenden zu sehen, während Thomassen⁹⁾ bei einem Kalb nach intraokularer Impfung Tuberkulose in den sub-

1) Schottelius, Münch. med. Wochenschr. 1902. No. 39.

2) Deutsche med. Wochenschr. 1902. No. 32.

3) Fibiger und Jensen, Berl. klin. Wochenschr. 22. Sept. 1902.

4) Stuurman, Inaug.-Dissert. 1903.

5) Damman, Deutsche tierärztl. Wochenschr. 1904. No. 53.

6) Prettnner, Zeitschr. f. Tiermed. Bd. VI. 1902. Heft 2. Die Versuche datieren vor Koch, sind aber später veröffentlicht worden.

7) Ravenel, The comparative virulence of the tubercle bacillus from human and bovine sources. 1901. Sept.

8) Orth, Berl. klin. Wochenschr. 1902. No. 34.

9) Thomassen, Recueil de méd. vét. 1901. p. 529 und: Tijdschrift voor Veeartsenijkunde. Deel 28e. p. 547.

kulose des Rindes und des Menschen identisch seien, führte eine eng-parotidale Drüsen, den Halsdrüsen, Brustdrüsen und Lungen auf-treten sah.

Hamilton wiederholte auch die von Koch und Schütz gemachten Versuche; bei 15 Tieren konnte er tuberkulöse Veränderungen nachweisen.

Kossel, Weber und Heuss¹⁾ züchteten 41 Reinkulturen aus Sputum oder aus Menschenleichen. Während 37 dieser Stämme nach subkutaner Impfung bei Rindern nur lokale Erscheinungen hervorriefen, bewirkten 4 Stämme, daß die Versuchsrinder an ausgedehnter Tuberkulose verendeten. Diese letzteren 4 Stämme, welche aus Lungen und Lymphdrüsen des Mesenteriums von Kindern gezüchtet waren, stimmten auch morphologisch und in Kulturen mit den Bacillen der Rindertuberkulose überein.

Auch andere Forscher, wie Mohler, Lignières, Schweinitz und Schweder, Westerhöffer u. a. fanden, daß die aus den mesenterialen Lymphdrüsen von Kindern gezüchteten Bacillen für das Rind immer sehr virulent waren.

Von Bedeutung sind auch die verschiedenen an Affen vorgenommenen Versuche, da man mit einer gewissen Reserve hieraus auch einen Schluß auf den Menschen ziehen kann. Die von den verschiedenen Forschern ausgeführten Versuche ergeben, daß der Affe sowohl von dem Bacillus der menschlichen Tuberkulose als von dem der Rindertuberkulose infiziert wird, daß aber bei ihm der vom letztgenannten Bacillus verursachte Prozeß schneller verläuft. Experimente in dieser Richtung haben ausgeführt Nocard²⁾, Macfadyen³⁾, de Jong, Grünbaum⁴⁾, Salmon und verschiedene andere.

Auch bei Menschen hat man Infektionen wahrgenommen, die ihr Entstehen seiner Empfänglichkeit für eine Infektion vonseiten des Bacillus der Rindertuberkulose zu danken hatten. Es handelte sich gewöhnlich um Personen, welche nach der Art ihres Berufes derartigen Infektionen wiederholt ausgesetzt sind, wie Tierärzte und Fleischer. Gewöhnlich tritt dann hier eine Infektion ein, die von einer Verwundung an den Händen oder den Fingern ausgeht; derartige Fälle wurden von de Jong, Ravenel⁵⁾, Ostertag, Jensen, Basenau und Van der Sluis⁶⁾ u. a. mitgeteilt.

Jensen berichtet auch von einem derartigen Falle, in welchem eine Verwundung des Gesichtes stattgefunden hatte.

Lassar behauptet, daß Hauttuberkulose vielfach in Schlachthäusern vorkomme; er selbst hat 7 Fälle beobachtet.

Grothan, Priester, Leloir, Salmon sahen auf der Gesichtshaut Tuberkulose auftreten, und zwar nach wiederholtem Einreiben der Haut mit Milch.

Nach Infektionen von Wunden der Gelenke hat man allgemeine Tuberkulose auftreten sehen.

Umfangreiche Versuche zur Beantwortung der Frage, ob die Tuber-

1) Heuss, Tuberkulosearbeiten, a. d. Kaiserl. Gesundheitsamte. Heft 1. Berlin 1904.

2) Nocard, *Revue génér. de méd. vétérin.* 1903. No. 1.

3) Macfadyen, Upon the virulence of the bacillus of bovine and human tuberculosis for monkeys. (*The Lancet.* 1903. Sept. 9.)

4) Grünbaum, *Verhandl. d. Tuberkul.-Komm. d. Ges. deutsch. Naturf. u. Aerzte.* 1901/1902. p. 36.

5) Ravenel, A case of tuberculosis of the skin following a dental intervention with the bovine tubercle bacillus. (*Patholog. Soc. of Philadelphia.* 19. Dec. 1901.)

6) *Zeitschr. f. Fleisch- u. Milchhyg.* 1909.

lische Kommission¹⁾ aus, die sich nach Kochs Erklärung von 1901 bildete.

In dieser Kommission saßen außer dem Physiologen Forster u. a. die Pathologen Woodhead, Martin, John, Macfadyen und Boyce.

Die Kommission hatte sich folgende drei Hauptfragen gestellt: Ist die Tuberkulose des Menschen und des Tieres dieselbe Krankheit? Können Mensch und Tier einander anstecken? Unter welchen Umständen — wenn dies wirklich der Fall sein sollte — findet dann die Infektion vom Tiere auf den Menschen statt, und welche Verhältnisse arbeiten dieser Infektion in die Hand oder können sie verhindern?

Das Ergebnis ihrer glänzenden und umfangreichen Untersuchungen faßte die Kommission in folgende Sätze zusammen:

Es kann keinem Zweifel unterliegen, daß in einer gewissen Anzahl von Tuberkulosefällen beim Menschen und besonders beim Kinde die Krankheit das direkte Resultat der Infektion des menschlichen Körpers durch den Bacillus der Rindertuberkulose ist; auch kann es nicht zweifelhaft sein, daß in der Mehrzahl dieser Fälle die Ansteckung durch den Genuß von Kuhmilch entsteht. Kuhmilch, die die Bacillen der Rindertuberkulose enthält, ist sicherlich eine Ursache der tödlich verlaufenden Tuberkulose beim Menschen.

Von den 60 Fällen menschlicher Tuberkulose, die von uns untersucht wurden, enthielten 14 (Gruppe 1) den Bacillus der Rindertuberkulose. Beschränken wir uns, anstatt alle 60 Fälle zu berücksichtigen, auf diejenigen, in welchen die Bacillen offenbar durch den Verdauungskanal eingeführt worden waren, so wird das Verhältnis der Gruppe 1 noch viel größer. Unter den insgesamt 60 Fällen, die wir untersucht haben, fanden sich 28, bei denen die klinischen Erscheinungen darauf hinwiesen, daß der Bacillus durch den Verdauungskanal eingedrungen war. Von diesen gehörten 13 zu Gruppe 1. Von den 9 Fällen, in denen Halsdrüsen untersucht wurden, gehörten 3, und von den 19 Fällen von Bauchtuberkulose 10 zur Gruppe 1. Diese Tatsachen weisen darauf hin, daß eine große Anzahl der durch die Nahrungsaufnahme einverleibten Tuberkelbacillen vom Rinde stammen.

Ein sehr beträchtlicher Teil der Krankheiten und Todesfälle, besonders im Kindesalter, muß auf den Genuß tuberkulöser Milch zurückgeführt werden. Die Anwesenheit von Tuberkelbacillen in der Kuhmilch kann, wenn auch mit einiger Schwierigkeit, durch Anwendung geeigneter Methoden entdeckt werden, und solche Milch darf niemals als Nahrung verwendet werden. Viel leichter ist der klinische Nachweis, daß eine Kuh bestimmt an Tuberkulose leidet, und dann ist es auch wahrscheinlich, daß ihre Milch Bacillen enthält. Die Milch einer solchen Kuh darf weder zur Ernährung von Menschen noch von Tieren dienen. Unsere Beobachtungen fordern mit Bestimmtheit die Anwendung strengerer Maßregeln, als sie jetzt in Geltung sind, zur Verhütung des Verkaufes und Genusses derartiger Milch.“

Es kann also wohl als Tatsache angenommen werden, daß der Bacillus der Rindertuberkulose imstande ist, beim Menschen Tuberkulose hervorzurufen. Hieraus ergibt sich von selbst die Notwendigkeit, daß Maßregeln zu treffen sind, welche dieser Gefahr entgegenzutreten.

1) Royal Commission of Tuberculosis (human and bovine). Second interim report of the Royal Commission appointed to inquire into the relations of human and animal tuberculosis. Part I. 98 p. London (Wyman & Sons) 1907.

Welche Mittel stehen uns nun hierfür zu Gebote?

Das einzige, praktisch durchführbare Mittel ist die Erwärmung. Bei Fleisch geht dies leicht durch Sterilisation, bei der Milch jedoch, die in bezug auf die Uebertragung tierischer Tuberkulose auf den Menschen gewiß den ersten Platz einnimmt, ist es praktisch nicht so einfach, weil durch eine länger dauernde und hohe Erhitzung die Milch in ihren Eigenschaften, namentlich im Geschmack, in Farbe, Geruch, in den Eiweißen, Salzen, kurz in ihrer Zusammensetzung Veränderungen erfährt.

Daher kommt es denn auch, daß man danach gestrebt hat, die Tuberkelbacillen in der Milch bei einer möglichst niedrigen und kurze Zeit einwirkenden Temperatur zu vernichten.

Obwohl hierzulande in erster Linie die Pasteurisierungsmethode Forsters¹⁾ und seiner Schule in der Praxis Anwendung findet, ist vor allem nach den Untersuchungen de Jongs²⁾ die Frage aufgeworfen worden, ob das Pasteurisieren auf Grund der Untersuchungen Forsters tatsächlich genügend ist, um stets die Tuberkelbacillen in der Milch zu töten. De Jong kam zu dem Resultate, daß diese Frage verneinend beantwortet werden müsse. De Jong hatte jedoch keine natürlich infizierte Milch benutzt und sie überdies mit einer so großen Menge Bacillen vermischt, wie sie wohl nie in natürlich infizierter Milch vorkommen werden. Wenigstens gelangten wir im Laufe der vielen von uns vorgenommenen Versuche zu großen Unterschieden. Die Anzahl Bacillen in natürlich infizierter Milch, selbst in Milch, die ausschließlich dem tuberkulösen Teile des Euters entnommen worden war, erwies sich stets viel kleiner als die Anzahl Bacillen, die gefunden wurde, wenn Milch mit den von de Jong verwandten Mengen vermischt worden war.

Die Möglichkeit war also nicht ausgeschlossen, worauf Basenau³⁾ schon aufmerksam gemacht hatte, daß ganz andere Resultate erzielt werden würden, wie die von de Jong erhaltenen, wenn man mit natürlich infizierter Milch experimentierte, und daß doch der gebräuchliche Pasteurisierungsprozeß sich als genügend erweisen werde, um die Tuberkelbacillen in der Milch zu töten.

Bevor ich zur näheren Beschreibung der ausgeführten Versuche übergehe, möge hier zunächst eine kurze Uebersicht über die Literatur dieses Gegenstandes folgen.

Die Zahl der Forscher, die sich mit dieser Frage beschäftigt haben, ist nicht klein. Der Deutlichkeit halber verteile ich sie in zwei Gruppen, eine Gruppe umfaßt diejenigen, die mit künstlich infizierter Milch gearbeitet haben, die also die Tuberkelbacillen, sei es aus Kulturen oder aus Organen, mit der Milch vermischten; die andere Gruppe dagegen diejenigen, welche mit dem natürlich infizierten Produkte experimentierten. Es ist gewiß auffallend, welche divergierenden Resultate die verschiedenen Forscher erzielt haben.

Zu der ersten Gruppe von Forschern rechne ich zunächst May⁴⁾. Er vermischte Milch mit tuberkulösem Lungengewebe, erhitzte sie dann bis zum Kochen, wie es gewöhnlich im Haushalte geschieht, und fand, daß die als Versuchstiere benutzten Meerschweinchen nach der Impfung gesund blieben.

1) Ueber die Einwirkung hoher Temperaturen auf Tuberkelbacillen. (Hyg. Rundschau. 1893.)

2) Intern. Milchkongreß, Scheveningen 1908.

3) Bakterien und Enzyme der Milch. (2. Congrès intern. des Gouttes de Lait. Brüssel 1907.)

4) May, Arch. f. Hyg. Bd. I. 1883. p. 121.

Schill und Fischer¹⁾ fanden, daß Wasserdampf von 100° C trockenes Sputum in einer Stunde, feuchtes in $\frac{1}{4}$ Stunde unschädlich machte. Frisches, feuchtes Sputum von Phthisikern wurde durch eine 15 Minuten währende Einwirkung von Dampf (100° C) oder durch 10 bis 20 Minuten dauerndes Kochen ebenfalls unschädlich gemacht, während altes, trockenes Sputum zu gleichem Zwecke ein 5 Minuten dauerndes Kochen in Wasser verlangte.

Sormani²⁾ vermischte die Milch mit Reinkulturen und erhitzte sie alsdann während 10 Minuten bis 70°, 80° und 90°. Alle Versuchstiere erwiesen sich nach 41 Tagen als tuberkulös. Dasselbe Resultat erzielte er, wenn die Milch zum Kochen gebracht wurde. Kochte er jedoch 5 Minuten lang und kühlte darauf ab, so blieben die Meerschweinchen nach der Impfung gesund.

Grancher und de Gennes³⁾ konnten tuberkulöse Sputa durch 10 Minuten währendes Erhitzen bis 80° C beinahe unschädlich machen; bestimmt aber gelang ihnen dies durch ein gleichlanges Erhitzen bei einer Temperatur von 90 bis 100° C. Sie hatten das Sputum mit sterilisiertem Wasser vermischt und dies erhitzt bis zu 60°, 80°, 90° und 100° C, während sie es fortwährend umrührten. Sobald eine der obengenannten Temperaturen erreicht worden war, nahmen sie einen kleinen Teil aus der Masse und impften damit die Tiere intraperitoneal. Hatte eine Temperatur von etwa 90° C 10 Minuten lang auf die Flüssigkeit eingewirkt, so blieben die Versuchstiere gesund.

Yersin⁴⁾ experimentierte mit Reinkulturen von Tuberkelbacillen und fand, daß sie nach einer 10 Minuten dauernden Erhitzung bis 70° C getötet waren, aber nicht, wenn er während einer gleich langen Zeit bis zu 65° erwärmte.

Bitter⁵⁾ erhitzte eine Aufschwemmung von tuberkulösem Sputum in Milch bis 68° oder 69° C während 20, 30, 35 Minuten; alle Tiere erwiesen sich nach der Impfung als gesund, während das Kontrolltier nach 5 Wochen an Tuberkulose einging.

Marshall⁶⁾ erhitzte 20 Minuten lang bis 68°, kühlte alsdann ab und fand, daß die Tuberkelbacillen getötet waren; dabei blieb die Milch ohne Kochgeschmack.

Smith⁷⁾ fand, daß Tuberkelbacillen in destilliertem Wasser, in physiologischer Kochsalzlösung, in Bouillon oder Milch durch ein Erhitzen bis zu 60° C in 15–20 Minuten getötet wurden, die meisten bereits nach 5–10 Minuten. In der auf der Milch befindlichen Haut konnte er jedoch noch nach 60 Minuten lebende Tuberkelbacillen nachweisen.

Hesse⁸⁾ bestätigt Smiths Resultate; er fand zugleich, daß ein während 15–20 Minuten angewandtes Erhitzen bis zu 60° auch Typhus-, Cholera- und Pestbacillen unschädlich machte.

Zu den Forschern, welche mit natürlich infizierter Milch experimentierten, gehört u. a.

1) Schill u. Fischer, Mitteil. a. d. Kaiserl. Gesundheitsamte. Bd. II. 1884. p. 13.

2) Sormani, Annali univers. di medic. 1884. p. 269.

3) Grancher und de Gennes, Annales d'hygiène publ. T. XIX. p. 357.

4) Yersin, Annal. de l'Institut. Pasteur. 1888.

5) Bitter, Zeitschr. f. Hyg. Bd. VIII. No. 2.

6) Marshall, Fleisch- und Milchhyg. Bd. XII. p. 156.

7) Smith, Journ. of experim. Medicine. 1899. No. 2.

8) Hesse, Zeitschr. f. Hyg. Bd. XLII. 1903. p. 175, u. Zeitschr. f. Tiermed. Bd. V.

Bang¹⁾. Eine Temperatur von 72°, die 15 Minuten andauerte, war hinreichend, das Virus zu töten; denn nach der Impfung blieben alle Kaninchen gesund. Weitere Untersuchungen ergaben, daß 65° C in 5 Minuten wohl die Virulenz der Tuberkelbacillen schwächte, die Bacillen jedoch nicht tötete, während Milch, die bis auf 70° C erwärmt worden war, nicht mehr imstande war, Kaninchen tuberkulös zu machen.

Später²⁾ stellte sich Bang indessen auf den Standpunkt, daß 85° C nötig seien, um Tuberkelbacillen vollständig zu vernichten. Ein 5 Minuten währendes Erhitzen der Milch auf 60° und 75° C bewirke aber schon, daß die Virulenz der Bacillen so weit abnehme, daß die Milch beim Gebrauche als Nahrungsmittel keine Tuberkulose mehr hervorrufen könne, wohl aber bei Impfung.

Morgenroth³⁾ erhitze die Milch während 10 Minuten auf 70°, kühle sie dann schnell ab, fand sie jedoch nach intraperitonealer Impfung noch infektiös. Er erhitze dann ferner bis 100° C, kühle ebenfalls wieder schnell ab und impfte 5 Meerschweinchen. Von diesen 5 Tieren zeigten 2 nach 3½ Monaten verkäste Mesenterialdrüsen. Nach Morgenroth ist es nötig, die Milch 30 Minuten lang auf 70° zu erhitzen, um die Tuberkelbacillen zu töten, während eine Temperatur von 100° nur 3–5 Minuten einzuwirken braucht.

Galtier⁴⁾ fand die Milch noch virulent, nachdem sie 6 Minuten lang bis auf 70°, 75°, 80° und 85° C erhitzt worden war.

Beck⁵⁾ fand, daß sowohl natürlich wie auch künstlich infizierte Milch eine Temperatur von 80° ½ Stunde lang vertragen konnte, ebenso auch ganz kurzes Kochen, ohne daß die Tuberkelbacillen absterben. Nach 3 Minuten dauerndem Kochen jedoch fand er keine lebenden Tuberkelbacillen mehr.

Im Jahre 1893 stellte de Man⁶⁾ in Forsters Laboratorium Versuche an über die Absterbungstemperatur des Tuberkelbacillus. Er gelangte zu dem Ergebnis, daß der Bacillus abstirbt bei:

55° C	in	4 Stunden
60°	"	1 Stunde
65°	"	15 Minuten
70°	"	10 "
80°	"	5 "
90°	"	2 "
95°	"	1 Minute

Bereits im Jahre 1889 hatte van Geuns⁷⁾ ebenfalls in Forsters Laboratorium Untersuchungen über die Temperatur ausgeführt, bei welcher verschiedene Mikroorganismen absterben. Hierbei war er zu dem Ergebnis gekommen, daß die Coli-Bacillen sich am resistentesten erweisen und erst absterben bei 59° C in 5 Minuten, die Typhusbacillen bei 56° C in 5 Minuten, und die Cholerabacillen schon bei 54° in derselben Zeit.

Auf Grund dieser Versuche nun hat man eine besondere Methode der Milcherhitzung im großen in der Praxis in Anwendung gebracht.

1) Bang, Deutsche Zeitschr. f. Tiermed. u. vergleich. Pathologie. Bd. XII. No. 2.

2) Bang, Congrès pour l'étude de la tuberculose chez l'homme et chez les animaux. Paris 1888.

3) Morgenroth, Hyg. Rundschau. 1900. p. 865.

4) Galtier, Compt. rend. de la Soc. de biol. 1900. Heft 3.

5) Beck, Deutsche Vierteljahrsschr. f. öffentl. Gesundheitspfl. 1900. Heft 3.

6) de Man, Ueber die Einwirkung hoher Temperaturen auf Tuberkelbacillen. Inaug.-Dissert. 1893.

7) Van Geuns, Archiv f. Hyg. Bd. IX. p. 369.

Die nach dieser Methode behandelte Milch bringt man unter dem von Forster vorgeschlagenen Namen: „Krankheitskeimfreie Milch“ in den Handel. Im allgemeinen besteht heute diese Methode darin, die Flaschenmilch während $\frac{1}{2}$ Stunde auf $70-72^{\circ}\text{C}$ mit einer Vorerwärmung von etwa 30 Minuten zu erwärmen.

Forster¹⁾ schreibt hierüber folgendes:

„Unsere Erfahrungen sind vom praktisch-hygienischen Standpunkte aus nicht ohne Bedeutung. Denn schon seit längerer Zeit wird in verschiedenen Städten sogenannte pasteurisierte Milch verkauft, von welcher allgemein behauptet und angenommen wird, daß sie durch eine vorhergehende Erwärmung frei von krankmachenden Bakterien gemacht wäre. Nun werden in der Milchwirtschaft zwei Gruppen von Apparaten für das Pasteurisieren, d. h. das Erwärmen auf Temperaturen, bei welchen die Milch noch nicht den bekannten Kochgeschmack annimmt, gebracht. Die eine Gruppe betrifft Apparate, mittels welcher die zu behandelnde Milch an erhitzten Metallflächen vorbeiströmt und so auf die gewünschte Temperatur (60° , 66° , 70°C) erwärmt wird; die zweite Gruppe umfaßt die Sorte von Apparaten, mittels welcher die nicht strömende, stehende Milch in Kesseln, Flaschen usw. langsam erwärmt auf einer bestimmten Temperatur gehalten wird.“

Während für manche Molkereizwecke die erste Weise des Erwärmens sehr wohl mit Nutzen angewendet werden kann, ja selbst bei gewissenhafter Ausführung, nach den Untersuchungen von van Geuns, genügend ist, um eventuell in die Milch geratene Cholera- und Typhusbacillen zu töten, reicht sie, wie auf Grund der Versuche Dr. de Mans leicht einzusehen ist, durchaus nicht dazu hin, um das Leben von Tuberkelbacillen zu vernichten; dies würde erst dann der Fall sein, wenn auf Temperaturen erhitzt würde (95°C und darüber), bei welchen Geschmack, Farbe und Aussehen der Milch verändert werden.

Nur die Anwendung von Einrichtungen der zweiten Art macht es, eine zuverlässige und sachkundige Behandlung vorausgesetzt, möglich, daß die Milch eine bestimmte Zeitlang auf einer Temperatur gehalten wird, bei der — ohne daß eine Veränderung von Geschmack und Aussehen eingetreten — mit Sicherheit auch das Leben der Tuberkelbacillen vernichtet wird. Es erscheint zweckmäßig, für die auf die erstgenannte Weise erwärmte Milch die Bezeichnung „pasteurisierte Milch“ beizubehalten, die auf letztgenannte Art erwärmte Milch dagegen, welche beispielsweise seit einiger Zeit nach meinen Anweisungen von einer hiesigen Milcheinrichtung für Bereitung von Dauermilch geliefert wird, „krankheitskeimfreie Milch“ zu nennen.

De Jong²⁾ weist nun auf Grund seiner Untersuchungen mit Nachdruck darauf hin, daß es nicht statthaft sei, die nach obiger Methode pasteurisierte Milch auch „krankheitskeimfrei“ zu nennen.

Zu dieser Auffassung kam er auf Grund folgender Versuche.

Die Milch von Kühen, welche soviel wie möglich anti- und aseptisch gemolken worden waren, wurde mit Kulturen von Tuberkelbacillen vermischt, und zwar so, daß auf 500 ccm Milch 5 mg Tuberkelbacillen kamen. Die Mischung fand mit Hilfe steriler Mörser statt. Diese

1) Forster, Ueber die Einwirkung hoher Temperaturen auf Tuberkelbacillen. (Hyg. Rundsch. 1. Aug. 1893.)

2) De Jong, Voordracht gehouden in de melkhyg. vereeniging op 10 April 1906. (Nederl. Weekblad v. Zuivelbereiding en Veeveelt. — Nederlandsch Tijdschr. voor Geneeskunde. 1909. Januar. — Centralbl. f. Bakt. etc. Abt. I. Orig. Bd. XLVIII. p. 670.)

künstlich infizierte Milch wurde in Flaschen gefüllt, wie sie in den Milchfabriken benutzt werden.

Die Pasteurisation wurde nun so vorgenommen, wie sie in der Praxis geschieht, d. h. die Flaschen wurden $\frac{1}{2}$ Stunde lang bis auf $71-72^{\circ}\text{C}$ erwärmt. Die Vorerwärmung dauerte ebenfalls $\frac{1}{2}$ Stunde. Nach der Pasteurisierung kühlte man mit Eiswasser schnell ab.

Mittels Impfung von Meerschweinchen wurde alsdann untersucht, ob die Bacillen abgestorben seien. Zu jedem Versuche benutzte man 8 Meerschweinchen, und zwar wurden 2 mit der nicht infizierten Milch, 2 mit der infizierten, nicht pasteurisierten, und 4 mit der pasteurisierten Milch geimpft. Die Impfung der Tiere geschah in folgender Weise:

Von der zu untersuchenden Milch zentrifugierte man in einer elektrischen Zentrifuge, die 3200 Umdrehungen in der Minute machte, während einer Viertelstunde 20 ccm. Nach dem Zentrifugieren wurden Präzipitat und Rahm mit der entrahmten Milch zu einer Mischung von 10 ccm vermengt; jedem Tier injizierte man nun 10 ccm, entweder subkutan an der Innenfläche der Schenkel, also je 5 ccm rechts und je 5 ccm links, oder auch in die Bauchhöhle.

De Jong gelangt nun zu der Schlußfolgerung, „daß ein $\frac{1}{2}$ Stunde währendes Pasteurisieren bei $71-72^{\circ}\text{C}$ nebst einer vorhergehenden, die gleiche Zeit dauernden Vorerwärmung nicht imstande sei, in allen Fällen die Tuberkelbacillen zu töten; daß namentlich für die Bacillen der Rindertuberkulose, um die es sich bei der Milch doch vor allem handelt, diese Temperatur nicht genügend sei“.

Es ist außer Frage, daß die Ergebnisse der Forster-de Manschen Versuche bei der ausgezeichneten Versuchsanordnung und bei der bis in die feinsten Einzelheiten exakten Arbeitsweise, wie diese im Forsterschen Laboratorium bekanntermaßen üblich ist, zweifellos richtig sind. Nach den Versuchen von de Jong konnte aber die Frage aufgeworfen werden, ob die Resultate, erhalten durch die Erwärmung solch kleiner Mengen Milch, wie sie von Forster-de Man verwandt wurden, ohne weiteres in die Praxis zu übertragen sind.

Von Basenau¹⁾ und auch von Ostertag²⁾ wurde allerdings, wie schon oben bemerkt, die Ansicht ausgesprochen, daß die Versuche von de Jong insoweit nicht mit den tatsächlichen Verhältnissen übereinstimmen, als daß bei den Versuchen de Jongs nicht natürlich infizierte Milch verwendet wurde, und daß zweitens die Anzahl der künstlich in die Milch gebrachten Tuberkelbacillen viel größer war, als unter natürlichen Verhältnissen jemals vorkommt.

Aus diesen Gründen war im Prinzip die Möglichkeit vorhanden, daß man bei experimentellen Versuchen unter natürlichen Verhältnissen, d. h. also bei einer Verwendung von natürlich infizierter Milch zu anderen Ergebnissen kommen würde. Vom praktisch-hygienischen Standpunkte war es sicherlich bei der großen Verbreitung der sogenannten pasteurisierten Milch von großem Werte, diese Frage zu entscheiden. In erster Linie kam es uns darauf an, nicht allein Milch von Kühen zu erhalten, die auf Grund der klinischen Untersuchung tuberkulös waren, sondern die Milch von klinisch tuberkulösen Kühen zu verwenden, die wir schon bald nach der Milchentnahme töten konnten.

1) Bakterien und Enzyme der Milch. (2. Congrès Internat. d. Gouttes de Lait. Brüssel 1907.)

2) Internat. Milchkongreß. Scheveningen 1908.

Auf diese Weise waren wir imstande, durch die Sektion mit Sicherheit die Art und Ausbreitung der tuberkulösen Erkrankung festzustellen, und zwar, ob es sich um eine lokalisierte, um eine generalisierte oder auch um eine tuberkulöse Erkrankung des Euters handelte. Wir sind nun in der glücklichen Lage gewesen, eine größere Anzahl von Kühen zur Verfügung gehabt zu haben, die nach dem holländischen Gesetze¹⁾ vom Staate enteignet und dem Schlachthof in Amsterdam zur Schlachtung überwiesen waren.

Eine Anzahl dieser Tiere wurde in Observation gehalten, Milch von ihnen gewonnen und diese Milch nach der später zu beschreibenden Methode mikroskopisch auf Tuberkelbacillen untersucht. Mit Ausnahme einiger Fälle wurde, wie aus der Tabelle zu ersehen ist, stets mit Milch experimentiert, in der bereits mikroskopisch Tuberkelbacillen nachzuweisen waren. Es sei hier gleich vorweggenommen, daß es uns in allen Fällen von Eutertuberkulose gelang, durch eine einfache mikroskopische Untersuchung Tuberkelbacillen in der Milch aufzufinden. Auf diese Tatsache wird später noch näher eingegangen werden. So waren wir imstande, der Entnahme der Milch das Töten und die Sektion der Tiere schon bald folgen zu lassen.

Es war weiter unser Bestreben, nur solche Milch zu verwenden, die makroskopisch nicht verändert war, und die bei der Erwärmung auch nicht zum Teil koaguliert, d. h. dicker wurde. Es geschah dies aus der Ueberlegung heraus, daß durch die Gerinnung die Wärmeleitung anders als in normaler Milch wurde, wodurch eingeschlossene Tuberkelbacillen unter abnormale Verhältnisse gegenüber der tatsächlichen Erwärmung kommen konnten.

Die Erwärmung der Milch fand in derselben Weise statt, wie dies, wenigstens in Holland, in den meisten größeren Milchfabriken geschieht. Gewöhnliche Milchflaschen mit Bügelverschluß wurden mit der zu untersuchenden Milch gefüllt, in einen Pasteurisirapparat unter Wasser gebracht und dann auf der gewünschten Temperatur bestimmte Zeit gehalten. Nach der Erwärmung wurde die Milch möglichst schnell abgekühlt.

Im besonderen gestaltete sich die Versuchsanordnung, wie folgt:

Nachdem eine für unsere Versuche passende Kuh gefunden war, wurde die Milch nach vorabgehender Reinigung des ganzen Euters mit warmem Seifenwasser, Sublimat, Alkohol und Aether, Einschlagen des ganzen Rumpfes in ein ausgekochtes Tuch mit 4 Löchern für die Zitzen, mit reinen desinfizierten Händen in sterile Flaschen gemolken.

Diese reinliche Gewinnung der Milch wurde deshalb angewandt, um soviel wie möglich eine Mischinfektion zu verhüten. Die Milch wurde dann sofort ins Laboratorium gebracht und mit den Versuchen begonnen. Mit jeder Milch wurden Kontrolltiere vor der Erwärmung geimpft. Jedem Versuchstiere wurde in der Inguinalgegend links und rechts je 5 ccm subkutan injiziert.

Diese 10 ccm für jedes Tier wurden sowohl von der rohen Milch als auch von der erwärmten Milch in folgender Weise erhalten. 100 ccm Milch wurden in die Zentrifuge gebracht und hier einer sehr intensiven Ausschleuderung unterworfen, die ungefähr $\frac{1}{2}$ Stunde dauerte. Als dann wurden 4 ccm Rahm abpipettiert, die entrahmte Milch bis auf ungefähr 6 ccm abgehebelt, das Sediment verteilt und dann Rahm mit dem

1) Besluit van 2. Sept. 1904. Staatsblad.

Versuchsreihe	No. der Milchkubh	Sektionsbefund	Rohe Milch							Erwärmte Milch							Besondere Bemerkungen
			No. des Meerschweinchens	(Gewicht des Tieres bei der Impfung)	(Gewicht des Tieres beim Tod)	Höhe der Erwärmung	Zeit der Erwärmung	Ergebnis des Impfversuches mit roher Milch	Gestorben oder getötet n. Tagen	No. des Meerschweinchens	(Gewicht des Tieres bei der Impfung)	(Gewicht des Tieres beim Tod)	Ergebnis des Impfversuches mit erwärmter Milch	Gestorben oder getötet n. Tagen	Resultat d. direkten mikroskop. Untersuchung der Milch		
1	I A.T.E.	Tuberkulose der Pleura, des Peritoneums, in den Bronch.-, Med.- u. Mes.-Drüsen, in Lungen, in den Port.-, Retrophar.-Drüsen, in Tonsillen, Uterus, Nieren, Gland., Inguin., Superf. u. Euter (links hinten)	1 2 3	335 347 340	247 315 360	65°	30 Min.	++ ++ ++	27 50 51	4 5 6	340 295 295	304 358 451	++ ++ ++	54 54 54	+ 		
2	I A.T.E.		7 8 9	495 620 570	510 556 490	65°	30 Min.	++ ++ ++	38 38 38	10 11 12	540 495 510	658 518 606	++ ++ ++	62 62 59	++ 		
3	II A.T.E.	Tuberkulose der Pleura, des Periton., in Lungen, in den Bronch.-, Med.- u. Mes.-Drüsen, in Uterus, Niere, Gland., Inguin., Superf. u. Euter (links hinten)	13 14 15	570 500 500	440 432 434	65°	30 Min.	++ ++ ++	42 42 42	16 17 18	535 550 457	777 635 607	-- -- --	117 117 35	++ 		
4	III L.T.	Tuberkulose in Lungen, in den Bronch.-, Med.- u. Mes.-Drüsen	19 20 21	420 375 415	335 225 345			-- -- .	53 50 6						-- 	Meerschw. No. 21 ist 6 Tage nach d. Impfung an einer Gastroenteritis gestorben Meerschw. No. 19 und 20 hatten starke Injektion der Haut- und Periton.-Gefäße, außerdem hämorrhag. Exsudat in der Bauchhöhle	

L.T.	u. Med.-Drüs., in Lungen, in den Port.-Drüs.; in Euter, Gland., Inguin., Superf. u. Gland., Iliaca interna ein nekrotischer Prozeß	23 24	403 412	741 701	Min.	— —	181 208	26 27	330 262	487 341	— —	148 128
6 V A.T.	Tuberkulose der Pleura, des Periton., in Lungen, Trachea, in den Bronch., Med., Mes.- und Port.- Drüs., in Leber, Milz, Niere und Uterus	28 29 30	390 323 495	240 325 310	70° Min.	· · —	9 2 39	31 32 33	405 305 340	300 240 600	· · —	10 10 150
Die Meersch. No. 28, 29, 31 und 32 sind an einer Gastroenteritis gestorben												
7 VI A.T. mit Erkrankg d. Fleisch- lymph- drüsen	Tuberkulose d. Pleura, in Lungen, in d. Bronch., Med., Retroph.- u. Mes.- Drüs., in Nieren, Gland., Cervic., Superf. u. Gland., Poplitea dext.	34 35 36	570 443 595	410 443 617	70° Min.	· + +	15 73 74	37 38 39	570 500 540	613 387 783	— — —	74 65 178
Meersch. No. 34 ist an einer akuten Infektion gestorben Meersch. No. 38 ist von anderem Meersch. ge- tötet												
8 VII A.T. und Euter- drüsen- tuber- kulose	Tuberkulose d. Pleura, in Lungen, in d. Bronch., Med.-Drüs., in die Tra- chea, in d. Mes.- u. Port.- Drüs., in Leber, in d. Retrophar., Subparot.- und Submaxill.-Drüs., Gland., Iliacae internae u. Gland., Inguin., Su- perf. (dextris et sinistr.)	40 41 42	470 420 445	330 305 285	70° Min.	· · +	76 14 76	43 44 45	422 408 398	615 434 220	— — —	109 161 64
Meersch. No. 41 ist 14 Tage nach der Impfung an einer akuten Infektion gestorben Meersch. No. 45 ist 64 Tage nach der Impfung ge- storben; die Sektion er- gab keine sichere Todes- ursache												
9 VIII A.T.E.	Tuberkulose der Pleura, des Periton., in Lungen, in den Bronch.- u. Med.- Drüs., in die Trachea, in den Mes.- und Port.- Drüs., in Leber, in den Retroph.- u. Subparot.- Drüs., in Uterus, in den Gland., Lumbalis und Gland., Cervic., Superf. im Euter (links hinten)	46 47 48	430 410 520	290 225 410	70° Min.	· + ·	42 41 11	49 50 51	275 365 255	200 235 315	· — —	22 34 81
Meersch. No. 48 ist 11 Tage nach der Impfung an einer akuten Infektion gestorben Meersch. No. 49 ist 22 Tage nach der Impfung ge- storben; die Peritoneal- gefäße waren injiziert, keine Tuberkulose												

— = Freie Tuberkulose. + = Erkrankung an allgemeiner Tuberkulose. + * = positiver Befund.
L.T. = Lokale Tuberkulose. A.T.E. = Allgemeine und Eutertuberkulose. A.T. = Allgemeine Tuberkulose. E. = Eutertuberkulose.

Versuchsreihe	No. der Milchkub	Sektionsbefund	Rohe Milch						Erwärmte Milch						Resultat d. direkten mikroskop. Untersuchung der Milch	Besondere Bemerkungen
			No. des Meer-schweinchens	Gewicht des Tieres bei der Impfung	Gewicht des Tieres beim Tod	Höhe der Erwärmung	Zeit der Erwärmung	Ergebnis des Impfersuches mit roher Milch	(gestorben oder getötet n. Tagen	No. des Meer-schweinchens	Gewicht des Tieres bei der Impfung	Gewicht des Tieres beim Tod	Ergebnis des Impfersuches mit erwärmter Milch	(gestorben oder getötet n. Tagen		
10	IX A.T.E.	Tuberkulose der Pleura, des Periton., in Lungen, in den Bronch.- u. Med.-Drüsen, in die Trachea, in den Mes.-, Port.- u. Retroph.-Drüs., in den Nieren, Euterdrüsen u. Euter (beide Hinter-viertel)	52 53 54	592 655 530	552 337 430	70°	30 Min.	· + ·	5 43 5	55 56 57	485 485 585	365 310 417	· · —	1 13 90	+	Die Milch dieses Rindes ist bis auf den Impfungstag in Verkehr gebracht Meersch. No. 52, 54, 55 u. 56 sind an einer akuten Infektion gestorben
11	IX A.T.E.		58 59 60	355 375 455	287 289 363	70°	30 Min.	++ ++ ++	39 39 38	61 62 63	530 415 435	488 506 518	++ ++ ++	74 75 75	+	
12	IX A.T.E.		64 65 66	438 551 555	315 452 458	70°	30 Min.	++ ++ ++	42 45 44	67 68 69	480 380 460	457 373 453	++ ++ ++	73 74 74	+	
13	X u. XI A.T.E.	X. Tuberkulose d. Pleura, in den Bronch.- u. Med.-Drüsen, in Lungen, in den Mes.-, Retroph.- u. Port.-Drüsen, in Nieren und Euter XI. Tuberkulosed. Pleura, des Peritoneums, in den Bronch.-, Med.-, Mes.- u. Port.-Drüsen, in der Leber und Milz, in den Retroph.-, Subparot.- u. Submaxill.-Drüsen u. in Gland., Cervic., Superf.	70 71 72	365 325 392	526 382 599	70°	30 Min.	++ ++ ++	69 68 69	73 74 75	364 369 392	692 527 639	— — —	194 113 194	—	

14	XII A.T.E.	Tuberkulose in Lungen, in den Bronch., Med., Retroph., Mes.- u. Port.- Drüsen, in Leber, Euter- drüse und Euter (links hinten)	76 77 78	385 415 400	370 374 270	70°	30 Min.	++ ++ ++	37 37 30	79 80 81	410 430 398	453 527 380	++ ++ ++	63 62 63	+
15	XII A.T.E.		82 83 84	260 259 258	328 286 275	70°	30 Min.	++ ++ ++	48 45 43	85 86 87	296 322 308	383 480 355	++ ++ ++	60 61 61	+
16	XII A.T.E.		88 89 90	470 490 340	425 339 320	70°	30 Min.	++ ++ ++	45 32 47	91 92 93	512 530 570	490 189 692	++ . ++	61 9 61	Meersch. No. 92 ist von anderem Meersch. ge- tötet worden
17	I A.T.E.		94 95 96	342 338 420	369 284 452	70°	30 Min.	++ ++ ++	41 41 37	97 98 99	365 370 362	492 360 472	++ ++ ++	42 33 42	+
18	XIII A.T.E.	Tuberkulose in den Retro- phar.-Drüs., in Lungen, in den Bronch., Med.- Drüsen, auf der Pleura, dem Peritoneum, in den Mes.- und Port.-Drüsen, in Uterus, Nieren, Neben- nieren, Gland., Cervic., Superf., dextra und im Euter ($\frac{3}{4}$)	100 101 102	450 493 500	362 384 429	70°	30 Min.	++ ++ ++	35 36 36	103 104 105	530 560 520	419 640 697	. ++ -	5 101 101	Meersch. No. 103 ist an einer akuten Infektion gestorben
19	XIII A.T.E.		106 107 108	430 410 419	376 310 452	70°	60 Min.	++ ++ ++	35 27 36	109 110 111	419 385 477	614 499 527	- ++ ++	59 84 50	+
20	XIII und XIV A.T.E.	XIV. Tuberkulose in den Bronch.- u. Med.-Drüsen, der Pleura, des Periton., in den Retroph., Mes.- u. Port.-Drüs., in Uterus Nieren, in den Gland., Cervic., Superf., Gland., Popliteae, Gland., Inguin., Superf. u. in dem Euter (links hinten)				70°	60 Min.			112 113 114 115 116 117	469 316 380 520 387 363	778 661 618 587 537 332	- - - ++ - .	132 132 132 42 53 7	Meersch. No. 117 ist 7 Tage nach d. Impfung an einer akuten Infekt. gestorben Weil schon in Untersu- chungsreihe 18 mit dieser Milch Kontrolltiere ge- impft waren u. auch jetzt Tuberkelbac. mikroskop. aufgefunden wurden, sind in diesem Falle keine Kontrolltiere geimpft

Versuchsreihe	No. der Milchkub	Sektionsbefund	Rohe Milch						Erwärmte Milch						Resultat d. direkter mikroskop. Untersuchung der Milch	Besondere Bemerkungen
			No. des Meer-schweinchens	Gewicht des Tieres bei der Impfung	Gewicht des Tieres beim Tod	Höhe der Erwärmung	Zeit der Erwärmung	Ergebnis des Impfversuches mit roher Milch	Gestorben oder getötet n. Tagen	No. des Meer-schweinchens	Gewicht des Tieres bei der Impfung	Gewicht des Tieres beim Tod	Ergebnis des Impfversuches mit erwärmter Milch	Gestorben oder getötet n. Tagen		
21	Mischmilch. Eine Fl. Milch von XIII ist gemischt mit 4 Fl. normaler Milch		118 119 120	413 435 320	394 365 284	70°	60 Min.	36 37 35		121 122 123	358 455 405	388 563 460	+++	37 37 37	+	
22	XV A.T.E.	Tuberkulose in d. Bronch., Med.- und Mes.-Drüsen, in Lungen, Leber, Nieren u. Euter (links hinten)	124 125 126	415 355 335	345 280 287	70°	60 Min.	++	42 41 34	127 128 129	305 320 315	394 376 419	+++	38 30 38	+	
23	XIII A.T.E.					75°	30 Min.			130 131 132 133 134 135	390 334 343 296 327 372	401 520 703 280 305 342	+ - - . . .	94 95 131 5 6 4	+	Da schon in Versuchsreihen 18 und 19 Kontrolltiere mit dieser Milch geimpft waren u. die mikroskop. Prüfung auf Tuberkelbac. auch jetzt positiv war, wurde von Kontrolltieren Abstand genommen Meersch. No. 133, 134 u. 135 gestorben an einer akuten Infektion
24	XV A.T.E.					75°	30 Min.			136 137 138 139 140 141	323 313 265 750 685 900	400 397 326 725 620 902	++++	34 34 28 103 56 103	+	Meersch. No. 140 hat kurz vor dem Tod 3 Junge geboren Weil schon in Versuchsreihe 22 3 Kontrolltiere mit Milch dieses Rindes geimpft wurden und die mikroskop. Untersuchung auch jetzt Tuberkelbac.

	In den Bronch., Med., Mes.- u. Port.-Drüsen, in den Gland., Iliacae internae, Gland., Lum-balis, in Uterus, Nieren u. Enter (links hinten)	114	600	420	+	53	147	505	807	—	112	
26	XVI A.T.E.					75°	60 Min.				+	88 86 88 136 136 136
								148 149 150 151 152 153	390 347 328 335 350 335	568 395 688 637 759 523		Weil schon in Versuchs- reihe 25 mit Milch dieses Rindes Kontrolltiere ge- impft sind u. bei mikro- skop. Prüfung wiederum Tuberkelbac. gefunden wurden, impften wir keine Kontrolltiere
27	XVII A.T.E.	154 155	507 442	400 410	75°	60 Min.	38 35	156 157 158 159	502 469 434 439	560 498 500 490	+	48 48 48 48
												Die Milch dieses Rindes war bis zum Impfungs- tag in Verkehr gebracht
28	XVI A.T.E.				80°	30 Min.		160 161 162 163 164 165	360 330 317 405 320 300	770 798 620 628 746 707	+	178 135 87 156 135 135
												Weil schon in Versuchs- reihe 25 mit Milch dieses Rindes 3 Kontrolltiere geimpft worden waren u. die mikroskop. Unter- suchung wiederum Tu- berkelbac. ergab, sind in diesem Falle keine Kon- trolltiere geimpft
29	XVII A.T.E.	166 167	426 535	400 417	80°	30 Min.	42 43	168 169 170 171	507 430 535 468	569 573 741 589	+	46 44 46 46
30	XVIII A.T.E.	172 173	434 524	422 517	80°	30 Min.	47 47	174 175 176 177	494 500 492 405	590 555 607 524	+	66 66 66 66

Versuchsreihe	No. der Milchkub	Sektionsbefund	Rohe Milch						Erwärmte Milch						Ergebnis d. direkten mikroskop. Untersuchung der Milch	Besondere Bemerkungen
			No. des Meer-schweinchens	Gewicht des Tieres bei der Impfung	Gewicht des Tieres beim Tod	Höhe der Erwärmung	Zeit der Erwärmung	Ergebnis des Impfversuches mit roher Milch	Gestorben oder getötet n. Tagen	No. des Meer-schweinchens	Gewicht bei der Impfung	Gewicht des Tieres beim Tod	Ergebnis des Impfversuches mit erwärmter Milch	Gestorben oder getötet n. Tagen		
31	XIX A.T.E.	Tuberk. d. Pleura, d. Perit., in den Lungen, Bronch., Med., Retrophar.- und Port.-Drüsen, in Uterus, Nieren, in den Gland., Inguin., Superf. und im Euter (beide Hinterviertel.)	178 179	545 385	422 300	80°	30 Min.	++	51 50	180 181 182 183	450 390 420 460	551 543 574 648	++ ++ ++ ++	60 82 32 60	+	
32	XVI A.T.E.					80°	60 Min.			184 185 186 187 188 189	440 310 270 448 300 330	691 692 593 774 672 635	— — — — — —	132 132 132 132 132 175	+	Weil schon bei früheren Impfungen Kontrolltiere mit Milch dieses Rindes geimpft waren u. auch jetzt wiederum Tuberkelbac. aufgefunden wurden, sind in diesem Falle keine Kontrolltiere geimpft
33	XIX A.T.E.		190 191	315 400	300 350	80°	60 Min.	++ ++	55 56	192 193 194 195	580 590 403 330	653 715 430 634	— — — —	60 60 60 60	+	
34	XX A.T.E.	Tuberkulose der Pleura, in Lungen, in den Bronch., Med., Retroph.- u. Mes.-Drüsen, in Leber, Nieren, in Gland., Inguin., Superf. u. Euter (alle Viertel)	196 197	425 385	297 275	80°	60 Min.	++ ++	41 41	198 199 200 201 202 203	455 430 480 540 475 378	606 587 622 775 618 565	— — — — — —	66 66 66 66 66 66	+	
35	XIX A.T.E.		204 205	350 300	298 260	85°	30 Min.	++ ++	52 52	206 207 208 209	430 328 305 330	623 504 634 660	— ++ ++ ++	59 59 59 59	+	

Versuchsreihe	Erwärmte Milch										Besondere Bemerkungen
	No. des Meer-schweinchens	Gewicht des Tieres bei der Impfung	Tieres beim Tod	Höhe der Erwärmung	Zeit der Erwärmung	Ergebnis des Impfversuches mit roher Milch	(Gestorben oder getötet nach Tagen	No. des Meer-schweinchens	Gewicht des Tieres bei der Impfung	Gewicht des Tieres beim Tod	
1	Künstlich infizierte Milch. Boviner Typus	1 2 3	362 333 302	320 280 315	70°	30 Min.	+++	56 43 56	370 307 362	527 437 423	1400 ccm normaler Milch, herkömlich von einem gesunden Rinde, ist gemischt mit 20 mg Tuberkelbacillenkulturen. Diese Kulturen wurden in einem sterilen Mörser mit phys. Kochsalzlösung zu einer homogenen Emulsion zerrieben
2	Künstlich infizierte Milch. Boviner Typus	7 8 9	300 325 292	721 727 430	70°	60 Min.	+++	144 152 95	335 316 385	360 663 840	Die Milch infiziert, wie oben angegeben
	Erwärmte Milch										Rohe Milch
	Temperatur	Zeitdauer	Zahl der geimpften Tiere	Gestorben oder getötet u. erkrankt an Tuberkulose	Gestorben oder getötet und frei von Tuberkulose	Gestorben an einer akuten Infektion	Kontroll-tiere	Gestorben oder getötet u. erkrankt an Tuberkulose	Gestorben oder getötet und frei von Tuberkulose	Gestorben an einer akuten Infektion	
L.T.	70°	30 Min.	3	0	3	0	6	0	5	1	
A.T.E.	65°	30 Min.	9	6	3	0	9	9	0	0	
A.T. u. Erkrankung d. Fleischlymphdrüsen	70°	30 Min.	3	0	3	0	3	2	0	1	
A.T.	70°	30 Min.	3	0	1	2	3	0	1	2	
A.T. u. Erkrankung d. Euterlymphdrüsen	70°	30 Min.	3	0	3	0	3	2	0	1	
A.T.E.	70°	30 Min.	27	17	6	4	27	24	0	3	
A.T.E.	70°	60 Min.	18	10	6	2	12	12	0	0	
A.T.E.	75°	30 Min.	12	4	5	3	5	5	0	0	
A.T.E.	75°	60 Min.	13	6	7	0	6	6	0	0	
A.T.E.	80°	30 Min.	18	12	6	0	16	4	0	0	
A.T.E.	80°	60 Min.	16	0	16	0	4	6	0	0	
A.T.E.	85°	30 Min.	4	2	2	0	2	2	0	0	

verteilten Sediment gemischt. Vor der Einspritzung wurden von dieser Mischung Trockenpräparate gemacht, die auf Tuberkelbacillen ohne vorabgehende Entfettung der Präparate mit Anilinwasserfuchsin, Entfärbung mit Salzsäure-Alkohol und Nachbehandlung mit Löfflerschem Methylenblau gefärbt wurden.

Wie schon erwähnt, gelang es uns in allen Fällen, in der Milch die von Kühen mit Eutertuberkulose abstammte, wenn diese auch nur wenig ausgebreitet war, durch eine einfache mikroskopische Untersuchung Tuberkelbacillen, und zwar in wenigen Präparaten mit Sicherheit aufzufinden. Gerade dieses konstante Ergebnis erscheint uns vom praktischen Standpunkte aus für die Erkennung, ob in einer Milch Tuberkelbacillen vorhanden sind oder nicht, von nicht zu unterschätzender Bedeutung. Jedenfalls würde es wünschenswert sein, diese einfache nicht zeitraubende Art der Untersuchung von vielen Seiten zu erproben und anzuwenden. Bei dieser Art der Untersuchung ist es aber nötig, größere Mengen Milch, wie man bisher im allgemeinen gewöhnt war, lange und intensiv zu zentrifugieren. Wir zentrifugierten wenigstens 100 ccm. Es ist selbstverständlich, daß es sich bei Mengmilch als zweckmäßig erweist, noch größere Mengen zu zentrifugieren, doch auch bei starker Verdünnung gelang es uns, die Tuberkelbacillen in 100 ccm mikroskopisch aufzufinden.

Die Feststellung der Temperatur geschah mit genau kontrollierten Thermometern. Die Vorerwärmung der Milch bis auf die gewünschte Endtemperatur dauerte ungefähr 30 Minuten. Alsdann wurde die Milch mit sehr kleinen Schwankungen, die nie $0,5^{\circ}$ überschritten, auf der gewünschten Temperatur erhalten. Während der Erwärmung befand sich das Quecksilber des Thermometers im weitesten Teil einer Milchflasche, in der Nähe des Bodens. Hier wird die gewünschte Temperatur am spätesten erreicht. Alle Impfversuche wurden an Meerschweinchen angestellt.

In den vorstehenden Tabellen sind die Versuche übersichtlich zusammengestellt.

Bevor wir zur eingehenden Besprechung der in der Tabelle niedergelegten Versuche übergehen, möchten wir darauf hinweisen, daß während der Versuchszeit, die von Oktober 1907 bis Februar 1909 dauerte, von 16 Muttermeerschweinchen, die bei der Sektion eine allgemeine Tuberkulose aufwiesen, 36 Junge geboren wurden. Alle diese jungen Tiere wurden einer genauen Sektion unterworfen, mit dem Resultat, daß bei keinem der Tierchen irgendeine tuberkulöse Erkrankung festgestellt werden konnte.

Wie aus der Tabelle ersichtlich ist, wurden die ersten Versuche bei einer halbstündigen Erwärmung auf 65° C angestellt. Die Milch dieser 3 Versuchsreihen stammte von 2 Milchkühen, die an einer allgemeinen Tuberkulose mit Eutertuberkulose litten. In allen 3 Versuchen wurde bei der direkten mikroskopischen Untersuchung die Anwesenheit von Tuberkelbacillen festgestellt. Alle 9 mit der rohen Milch geimpften Tiere erkrankten an allgemeiner Tuberkulose. Die mit der erwärmten Milch geimpften Meerschweinchen auf der ersten und 2. Versuchsreihe gingen ebenfalls an allgemeiner Tuberkulose zugrunde, während die Tiere der 3. Versuchsreihe, mit der erwärmten Milch infiziert, nicht die geringste Erkrankung zeigten. Aus diesen ersten Versuchen ging jedenfalls mit Sicherheit hervor, daß es nicht gelingt, bei einer Erwärmung auf 65° C während einer halben Stunde die in der Milch vorhandenen

Tuberkelbacillen zu töten. Eine Erklärung für das Freibleiben der mit erwärmter Milch in der 3. Versuchsreihe konnte von uns nicht gefunden werden. Weiter unten wird indessen noch näher auf diese Erscheinung eingegangen werden. Es war also angebracht, mit höheren Temperaturen zu arbeiten und geschah dies bei den folgenden Versuchen bei 70° C. Bei dieser Temperatur wurde in zwei Versuchsreihen mit Milch experimentiert, die von 2 Kühen mit lokaler Tuberkulose abstammte, in einer Versuchsreihe mit Milch von einer Kuh mit allgemeiner Tuberkulose ohne Affektion der Fleischlymphdrüse, in einer vierten Versuchsreihe mit Milch von einer Kuh mit allgemeiner Tuberkulose und Affektion der Fleischlymphdrüsen; in einer weiteren Versuchsreihe mit Milch von einer Kuh mit allgemeiner Tuberkulose und Erkrankung der Euterlymphdrüsen, und schließlich in 9 Versuchsreihen mit Milch von Kühen mit allgemeiner Tuberkulose und gleichzeitiger Eutertuberkulose.

Es ergab sich in erster Linie, daß in der Milch aus den ersten beiden Versuchsreihen mit lokaler Tuberkulose weder durch die mikroskopische Untersuchung noch durch die Tierversuche Tuberkelbacillen gefunden werden konnten¹⁾. Alle Tiere, sowohl mit roher als mit erwärmter Milch geimpft, blieben vollständig gesund. Dasselbe Resultat wurde in der Versuchsreihe mit allgemeiner Tuberkulose erhalten. In der 7. Versuchsreihe indessen, wo die Milch von einer Kuh mit allgemeiner Tuberkulose und Affektion der Fleischlymphdrüsen herrührte, wurden zwar mikroskopisch keine Tuberkelbacillen gefunden, doch gingen zwei der mit roher Milch geimpften Versuchstiere an Tuberkulose ein, während die mit erwärmter Milch geimpften Meerschweinchen nicht an Tuberkulose erkrankten. Genau dasselbe Resultat ergab die 8. Versuchsreihe, wobei es sich um eine Kuh mit allgemeiner Tuberkulose und Euterdrüsentuberkulose handelte, allerdings mit dem Unterschied, daß mikroskopisch bereits Tuberkelbacillen in der Milch gefunden wurden.

In den weiteren 9 Versuchsreihen wurde mit Milch von Kühen mit allgemeiner und Eutertuberkulose experimentiert. Es wurden in diesen 9 Versuchen im ganzen 27 Meerschweinchen mit roher Milch und 27 Meerschweinchen mit erwärmter Milch geimpft. In allen 9 Milchsorten mit einer Ausnahme wurden bei der direkten mikroskopischen Untersuchung Tuberkelbacillen gefunden. Alle in Betracht kommenden, mit roher Milch geimpften Tiere gingen an generalisierter Tuberkulose zugrunde. Von den mit erwärmter Milch geimpften 27 Meerschweinchen starben noch 17 an allgemeiner Tuberkulose. Und zwar in 6 Versuchsreihen alle geimpften Meerschweinchen, in der 9., 10. und 13. Versuchsreihe kein einziges Tier. Aus dem negativen Impfresultat, z. B. der 13. Versuchsreihe, wobei auch gleichzeitig direkt mikroskopisch keine Tuberkelbacillen gefunden werden konnten, könnte man die Schlußfolgerung ziehen, daß bis zu einem gewissen Grade das positive resp. negative Impfresultat von der Menge der in der Milch anwesenden Tuberkelbacillen abhängig sein könnte, und zwar natürlich in dem Sinne, daß die Erwärmung imstande ist, noch eine kleinere Anzahl Tuberkelbacillen

1) Es sei hier bemerkt, daß, wie aus der Tabelle ersichtlich, wir in der ersten Zeit der Versuche eine Anzahl Tiere kurz nach der Impfung verloren. Durch eine eingehende systematische Untersuchung konnte festgestellt werden, daß Gemüse, aus einem bestimmten Laden bezogen, beinahe alle Tiere durch die Entstehung einer akuten Gastroenteritis tötete. Nachdem das Futter aus einem anderen Laden bezogen wurde, traten keine weiteren Todesfälle mehr ein. Leider gestattete es uns die Zeit nicht, diese an sich nicht uninteressante Tatsache weiter zu verfolgen.

abzutöten. Es könnte dies so erklärt werden, worauf *Basena*¹⁾ bereits früher aufmerksam machte, daß in einer größeren Anzahl von Mikroorganismen eine kleinere Anzahl Individuen sich befindet, die ein größeres Widerstandsvermögen besitzen. Wenn auch diese Tatsache zur Erklärung des wechselnden Resultates herangezogen werden kann, so neigen wir doch auch der Meinung zu, daß noch andere Faktoren hierbei von Einfluß sind. In erster Linie eine größere oder kleinere Anzahl organischer Elemente in der Milch, wie Leukocyten, Epithelien, Gewebe und Zellfragmente, die ihrerseits imstande sind, Tuberkelbacillen einzuschließen und durch Koagulation des Protoplasmas gleichsam einen schützenden Wall um die Tuberkelbacillen herum bilden, wodurch diese der vollen Einwirkung und Dauer der Erhitzung mehr oder weniger entzogen werden.

Jedenfalls ergaben die Erwärmungsversuche, daß es bei 70° C in einer halben Stunde ohne Zweifel nicht gelingt, in natürlich infizierter Milch die Tuberkelbacillen abzutöten. Es war also notwendig, entweder höhere Temperatur oder dieselbe Temperatur längere Zeit einwirken zu lassen. Wir wählten vorläufig das letztere und stellten in weiteren Versuchsreihen Versuche an bei 70° C während einer ganzen Stunde. Aber auch eine solche Erwärmung erwies sich als nicht imstande, die Milch frei von lebenden Tuberkelbacillen zu erhalten.

Wie sich aus der Tabelle ergibt, wurden noch ungefähr 62 Proz. der mit der erwärmten Milch geimpften Tiere tuberkulös. Wir stiegen nun mit der Temperatur bis auf 75°, wobei die Milch 30 Minuten erhitzt wurde. In zwei Versuchsreihen (23 bis 24) wurden 12 Tiere geimpft mit dem Ergebnis, daß noch ungefähr 45 Proz. derselben an Tuberkulose zugrunde gingen. Eine Erhitzung während einer halben Stunde auf 75° war also ebenfalls noch nicht imstande, die Milch frei von lebenden Tuberkelbacillen zu machen. Infolgedessen wurde in den drei folgenden Versuchsreihen (25 bis 27) die Milch einer Erwärmung auf 75° während einer ganzen Stunde ausgesetzt. Aber auch hierdurch gelang es nicht, die in der Milch vorhandenen Tuberkelbacillen zu vernichten. Die Versuche lehrten, daß noch ungefähr 46 Proz. der Tiere an allgemeiner Tuberkulose erkrankten.

Wir gingen noch einen Schritt weiter und erwärmten die Milch auf 80°, während einer halben Stunde. Für diese Versuche wurde die Milch von 4 verschiedenen Kühen (28 bis 31) mit dem Resultate verwandt, daß von den mit erwärmter Milch geimpften 18 Tieren noch 12 eine allgemeine Tuberkulose erwarben. Selbst diese Erhitzung führte also noch nicht zur Vernichtung der Tuberkelbacillen.

So wurde eine längere Erwärmung auf 80° C, und zwar eine Stunde, gewählt. Hier endlich war auf Grund der Versuchsergebnisse die Grenze erreicht. Alle in diesen Versuchsreihen mit erwärmter Milch (32 bis 34) geimpften Tiere blieben frei von Tuberkulose. Das gesamte Ergebnis kann also dahin zusammengefaßt werden, daß natürlich infizierte Milch, abkömmlisch von Tieren mit Eutertuberkulose, im allgemeinen erst durch eine Erwärmung auf 80° während einer Stunde unter den Verhältnissen der beschriebenen Versuchsanordnung, wobei die Milch in Flaschen, also in Ruhe, erwärmt wird, von lebenden Tuberkelbacillen frei gemacht werden kann. Alle Pasteurisationsverfahren, bei denen die Milch kürzere Zeit oder bei niedriger Temperatur erhitzt wird, geben also keine Gewähr,

1) l. c.

daß man über von lebenden Tuberkelbacillen freie Milch verfügen kann. Diese Erkenntnis ist vom hygienischen Standpunkte aus deshalb von dem größten praktischen Wert, weil der weitaus größere Teil der sogenannten pasteurisierten krankheitskeimfreien Milch aus Mischmilch hergestellt wird. Unter diesen Verhältnissen kann natürlich bei der großen Verbreitung der Tuberkulose unter dem Milchvieh Milch, abkömmlisch von einer tuberkulösen Kuh, eine größere Menge gesunder Milch infizieren. Selbst eine starke Verdünnung kranker mit gesunder Milch wird die Gefahr einer eventuellen Krankheitsübertragung nicht beseitigen können, wie die bekannten Versuche Ostertags früher schon bewiesen haben. In der Versuchsreihe (21) haben wir auch übrigens die Milch von Kuh (13) 5mal mit normaler Milch verdünnt, und ergab das Impfresultat, daß alle mit der erwärmten Milch geimpften Tiere an allgemeiner Tuberkulose erkrankten, während in den Versuchsreihen 18 und 19 nicht einmal alle Tiere tuberkulös wurden. Die 5-fache Verdünnung hatte also auf die Infektiosität der Milch nicht den geringsten Einfluß ausgeübt.

Als lehrreiches Beispiel dafür, daß die Milch selbst hochgradig tuberkulöser Tiere, in der sich zahlreiche Tuberkelbacillen befinden, noch in den Handel gebracht wird, können wir die Kühe 9 und 17 anführen. Die Milch dieser Tiere wurde ohne weiteres noch bis zu dem Tage, an dem die Tiere zur Abtötung auf den Schlachtviehhof kamen, verkauft. Kuh 9 gab noch pro Tag 8 und Kuh 17 14 Liter Milch. Mit solchen Beispielen vor Augen kann man sich auch die verhältnismäßig große Anzahl von Proben Marktmilch erklären, in der lebende Tuberkelbacillen gefunden werden. So fand z. B. Eber¹⁾, um nur eine der neuesten Untersuchungen zu erwähnen, in 10 Proz. der Marktmilchproben lebende Tuberkelbacillen. Das städtische Gesundheitsamt in London konnte in ungefähr 8 Proz. der untersuchten Milchproben lebende Tuberkelbacillen im letzten halben Jahr (1908) feststellen.

In gesundheitlicher Beziehung ist eine mangelhafte Pasteurisation mit Bezug hierauf deshalb doppelt gefährlich, weil der Konsument in der Voraussetzung, krankheitskeimfreie, also auch von Tuberkelbacillen freie Milch zu erhalten, diese im Haushalt oder sonstwie keiner weiteren besonderen Erwärmung unterwirft, wie dies wenigstens noch bei roher Milch in vielen Fällen geschieht.

Wenn man also nicht imstande ist, Milch von absolut gesunden Kühen, die unter ständiger tierärztlicher Kontrolle stehen und periodisch in nicht zu großen Intervallen tuberkulinisiert werden, zur Verfügung zu haben, dann ist es dringend notwendig, die Milch wenigstens 1 Stunde auf 80° zu erwärmen, wenn man mit Sicherheit krankheitskeimfreie Milch erhalten will.

Das bisher meist übliche Verfahren, die Milch eine halbe Stunde auf 70° C oder nur wenig höher zu erwärmen, ist hierzu nicht imstande. Es wurde auch für erwünscht erachtet, einige Versuche mit künstlich infizierter Milch anzustellen, um erstens uns selbst davon zu überzeugen, daß in der Tat durch die übliche Pasteurisation künstlich gezüchtete Tuberkelbacillen in Milch gebracht nicht getötet werden und ob zweitens sich ein Unterschied in dem Widerstandsvermögen zwischen künstlichen und natürlichen Tuberkelbacillen in der Milch ergeben würde. Durch diese Versuche, die in der Tabelle X niedergelegt sind, konnten wir die Resultate de Jongs bestätigen. Es ergab sich aber weiter, daß die

1) Zeitschr. f. Fleisch- u. Milchhygiene. Juli 1908.

natürlichen Tuberkelbacillen ihrer Vernichtung durch Erwärmung einen größeren Widerstand entgegensetzten, als die künstlich gezüchteten Bacillen. Während die letzteren durch eine einstündige Erhitzung auf 70° C getötet wurden, gelang dies, wie die obigen Versuche zeigen, bei den ersteren erst bei 80° C während derselben Erwärmungszeit. Das Widerstandsvermögen der Tuberkelbacillen in natürlich infizierter Milch ist also nicht unbelangreich größer als dasjenige der künstlich gezüchteten, die mit normaler Milch verrieben werden. Dies wird wohl zur Hauptsache seine Ursache darin finden, daß, wie schon oben auseinandergesetzt, in letzterer die morphologischen Elemente fehlen, die die Tuberkelbacillen der vollen Einwirkung der Erhitzung entziehen.

Der Vollständigkeit halber wollen wir noch einen kleinen Versuch erwähnen, den wir mit tuberkulöser Milch an 2 jungen Meerschweinchen von ungefähr 2 Monaten per os angestellt haben. Das eine Tier erhielt einmal 5 ccm Milch und das andere dreimal 5 ccm. Beide Tiere wurden nach 2 Monaten getötet und erwiesen sich von allgemeiner Tuberkulose befallen. Die Sektion ergab, daß der Prozeß der Lungen und der Mesenterialdrüsen in den Vordergrund trat, im Gegensatz zu den subkutan geimpften Tieren, bei welchen die Iliacal-, Lumbal- und die Inguinaldrüsen zuerst und am stärksten infiziert werden und der Lungenprozeß sich am spätesten entwickelt. Es ist dann auch wohl außer Frage, daß es sich bei diesen beiden Meerschweinchen um eine Fütterungstuberkulose handelt.

In Tabelle XI sind die Versuche nach Höhe der Temperatur und Zeit der Erwärmung kurz zusammengefaßt.

Das Resumé der ganzen Untersuchung kann in folgenden Schlußfolgerungen zusammengefaßt werden.

1) In der Milch der Tiere mit lokaler Tuberkulose konnten weder durch die mikroskopische Untersuchung, noch durch das Tierexperiment Tuberkelbacillen gefunden werden.

2) Bei allen Tieren mit allgemeiner Tuberkulose und Eutertuberkulose wurden durch eine verhältnismäßig einfache mikroskopische Untersuchung in allen Fällen mit einer Ausnahme Tuberkelbacillen in der Milch gefunden.

3) In keinem der Fälle, in denen die geimpften Tiere während der tuberkulösen Erkrankung Junge warfen, konnte eine intrauterine Infektion derselben festgestellt werden.

4) Künstlich gezüchtete Tuberkelbacillen, in Milch gebracht, zeigen nach unseren Versuchen ein geringeres Widerstandsvermögen gegenüber Erwärmung, als Tuberkelbacillen in natürlich infizierter Milch.

5) Es ist notwendig, die in natürlicher Weise mit Tuberkelbacillen infizierte Milch einer Erwärmung auf 80° C während einer Stunde mit einer Vorerwärmung von ungefähr einer halben Stunde zu unterwerfen, wenn man mit Sicherheit eine von lebenden infektionstüchtigen Tuberkelbacillen freie Milch erhalten will.

Es ist daher die Forderung zu erheben, daß Flaschenmilch, die unter dem Namen pasteurisierte „krankheitskeimfreie“ Milch in den Handel gebracht wird, wenigstens einer einstündigen Erwärmung auf 80° C unterworfen werden muß. Jede Milch, die kürzer oder niedriger erhitzt worden ist, birgt noch die Gefahr einer eventuellen tuberkulösen Krankheitsübertragung in sich.

Es ist mir eine besonders angenehme Pflicht, Herrn Privatdozenten Dr. Fritz Basenau meinen aufrichtigsten Dank für die Anregung zu dieser Arbeit und für seine stets bereite Unterstützung an dieser Stelle abzustatten. Ebenfalls sage ich dem Direktor am hiesigen Schlachtviehhof, Herrn D. Van der Sluys, meinen herzlichen Dank für das fortwährende Interesse, das er meinen Versuchen entgegengebracht hat.

Amsterdam, Februar 1909.

Nachdruck verboten.

Ueber das Mischungsverhältnis bei hämolytischen Proben.

[Aus der Königl. Universitäts-Kinderklinik in München
(Vorstand: Prof. M. Pfandler).]

Von Dr. Saburo Noda aus Japan.

Mit 1 Figur.

I. Der hämolytische Effekt bei Erythrocytenüberschuß.

In Gemeinschaft mit Herrn Privatdozenten Dr. E. Moro studierte ich das Verhalten der Bluthaptine in einem Falle von paroxysmaler Hämoglobinurie. Dabei stellten wir unter anderem den Donath-Landsteinerschen Versuch an und stießen auf ein eigentümliches Verhalten der hämolytischen Proben, das sich beispielsweise im Ausfall folgender Experimente kundgibt:

1 ccm Serum des Kranken + 0,2 ccm 50-proz. Erythrocytenbrei	$\left. \begin{array}{l} \text{Proben } \frac{1}{2} \text{ Std. lang bei } 5^{\circ} \text{ C.} \\ \text{dann 2 Std. im Brutschrank gehalten} \end{array} \right\}$	fast keine Hämol.	Serum fast farblos
Dasselbe Ser. + 0,1 ccm 50-proz. Erythrocytenbrei		deutliche Hämolyse	deutlich gerötet
" " + 0,05 ccm 50 " "		starke Hämolyse	blaßrubinrot
" " + 0,025 ccm 50 " "		fast kompl. Hämol.	stark rubinrot
" " + 0,01 ccm 50 " "		kompl. Hämolyse	weniger gefärbt
" " + 0,005 ccm 50 " "		kaum gefärbt	

Wie ersichtlich, trat hier eine Hämolyse nur bei Verwendung geringer Erythrocytenmengen ein, während die unter sonst gleichen Verhältnissen mit viel Erythrocyten angesetzte Probe eine Lösung fast ganz vermissen ließ. Eine bestimmte Serummenge vermochte im Kälte-Wärmeversuch wenig Blutkörperchen wirksam zu sensibilisieren, während anscheinend eine solche Sensibilisierung ausblieb, wenn derselben Serummenge mehr Blutkörperchen hinzugefügt wurden. Dieses Verhalten schien recht bemerkenswert in theoretischer Hinsicht, sowie auch insbesondere in praktischer. Verwendung eines Ueberschusses an Antigen kann eine sonst positive lytische Probe negativ ausfallen lassen. Moro und ich waren in der Tat schon geneigt, den Donath-Landsteinerschen Versuch in unserem Falle als negativ zu erklären, da wir, den Angaben dieser Autoren folgend, mit dem hier ungünstigen Mengungsverhältnisse zu arbeiten begonnen hatten.

Bei der paroxysmalen Hämoglobinurie handelt es sich, wie bekannt, um ganz abweichende und noch nicht nach allen Richtungen hin geklärte Verhältnisse. Es konnte sein, daß nur unter solchen Ausnahmeverhältnissen der Ueberschuß an Erythrocyten die Lösung behindert. Ich prüfte daher in folgender Versuchsreihe das Verhalten unter den typischen Versuchsbedingungen, nämlich in einem System, bestehend aus Hammel-

erythrocyten, inaktivem Hammelblutimmunserum vom Kaninchen und aktivem Merschweinchenserum.

Meerschweinchenserum enthält zumeist keine in Betracht kommenden Mengen von natürlichen Zwischenkörpern für Hammelerythrocyten, wirkt daher in solchem System lediglich als Komplement; gelegentlich trifft man aber Meerschweinchen, deren Serum im Kontrollversuch eine gewisse Menge von Hammelblutkörperchen direkt zu lösen vermag; bei Versuchen mit solchen Seris herrschen minder übersichtliche Verhältnisse; ich schied ihr Protokoll daher aus und teile nur von den durchweg gleichsinnig verlaufenen reinen Versuchen einige Beispiele mit.

Es wurde in folgender Weise verfahren: Ansteigende Mengen von 10-proz. Hammelerythrocytenemulsion wurden mit je 0,2 ccm $\frac{1}{10000}$ inaktiven Hammelblutimmunserums von Kaninchen durch $\frac{1}{2}$ Stunde in der Wärme digeriert, dann wurde zentrifugiert, der Erythrocytenrückstand einmal mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen, das Waschwasser entfernt und 0,1 ccm $\frac{1}{10}$ aktives Serum verschiedener Meerschweinchen zugesetzt. Nach neuerlicher 2-stündiger Digestion im Brutofen wurde der Lösungseffekt beobachtet und zum Zwecke seiner quantitativen Ermittlung eine Bestimmung des Hämoglobins im Blutkörperchenreste mittels Sahlis Hämoglobinometer nach Moros Methode vorgenommen. Die Differenz zwischen dem Hämoglobingehalte der ursprünglich zugesetzten Erythrocytenemulsion (ermittelt an der Kontrollprobe) und jenem des Blutkörperchenrestes, ausgedrückt in Sahli-Einheiten, mißt den Effekt der Hämolyse.

Serie I.

Menge der Erythrocytenemulsion in ccm		0,1	0,15	0,20	0,25	0,30	0,35	0,40
Deren Hämoglobinwert in Sahli-Einheiten		0,95	1,35	1,85	2,30	2,80	3,20	3,80
Lösungseffekt in Sahli-Ein- heiten	1) Meerschweinchenserum a	0,95	1,40	1,90	2,25	2,75	2,85	3,30
	2) " b	0,95	1,35	1,85	2,25	2,75	2,90	3,40
	3) " c	—	—	1,75	2,05	2,45	2,90	3,40
	4) " d	—	—	1,80	2,05	2,60	—	—
	5) " e	—	—	1,80	2,25	2,65	—	—
Mittlerer Lösungseffekt		0,95	1,37	1,82	2,17	2,69	2,88	3,37

In dieser Versuchsreihe kam nicht allein keine Verminderung des Lösungseffektes beim Ansteigen der Erythrocytenmenge zum Ausdruck, sondern sogar eine Vermehrung.

Daß keine Verminderung zutage trat, konnte an einem noch unzureichenden Erythrocytenüberschusse gelegen sein. Daher wurde in der folgenden Versuchsreihe die Blutkörperchenmenge weiter gesteigert.

Serie II.

Menge der Erythrocytenemulsion in ccm		0,3	0,5	1,0	1,5
Deren Hämoglobinwert in Sahli-Einheiten		2,70	4,50	9,00—9,05	13,50
Lösungseffekt in Sahli-Ein- heiten	1) Meerschweinchenserum f	2,40	3,75	4,50	(5,25?)
	2) " g	2,45	3,75	5,00	3,75
	3) " h	2,50	3,75	5,00	3,75
	Mittlerer Effekt	2,45	3,75	4,83	3,75

Hier kommt die hemmende Wirkung des Erythrocytenüberschusses bei Verwendung von 1,5 ccm Emulsion zum Ausdruck. Noch deutlicher wird das Verhalten in der folgenden

Serie III.

Menge der Erythrocytenemulsion in ccm	0,5	1,0	2,0	3,0
Deren Hämoglobinwert in Sahli-Einheiten	6,0	12,0	24,0	36,0
Lösungseffekt { 1) Meerschweinchenserum i	4,25	5,50	6,0	1,50
in Sahli-Ein- { 2) „ k	4,25	6,00	7,0	3,00
heiten { 3) „ l	4,50	6,00	7,0	3,00
Mittlerer Lösungseffekt	4,33	5,83	6,66	2,50

Die für die atypischen Blutkörperchen und Zwischenkörper des Hämoglobinurikers gemachte Beobachtung, daß ein gewisser Erythrocytenüberschuß den Effekt der Sensibilisierung durch bestimmte Mengen von Ambozeptoren vermindert, gilt sonach auch für das gewählte typische System. Auf Vermehrung der Antigenmenge erfolgt hier zunächst eine Steigerung des Lösungseffektes, dann aber eine Verminderung. Die Antigenmenge, bei der der Lösungseffekt sein Minimum erreicht, ist in den Versuchsserien II und III etwas verschieden; er dürfte von der disponiblen Komplementmenge abhängig sein.

Das Phänomen, auf welches hier hingewiesen wird, bezeichnen Fleckseder und v. Stejskal zwar als bekannt¹⁾, doch dürfte es in der hämolytischen Praxis immerhin mehr Beachtung verdienen, als ihm unseres Wissens zumeist geschenkt wird.

Ueber die für den Ausfall der Hämolyse maßgebenden Mengenverhältnisse der verschiedenen Haptine hat Arrhenius allgemeine Gesetze aufgestellt. Die Verteilung der Ambozeptoren erfolge im Prinzip nach den für die Verteilung eines löslichen Körpers zwischen 2 Lösungsmitteln geltenden Gesetzen; dabei sei noch das Verhältnis der Molekulargewichte der als Ambozeptor wirkenden Substanz im freien und im gebundenen Zustande maßgebend. Hiernach gilt nach Arrhenius bei der Hämolyse

$$1) \quad C = k \cdot c^{2/3}$$

wobei C die Konzentration der gebundenen Ambozeptoren in bezug auf die Blutkörperchenmasse,

c die Konzentration der freien Ambozeptoren in bezug auf die Serummasse (beides nach erfolgter Sensibilisierung),

k eine Konstante bedeuten.

Bezeichnet man dann weiter als

A die absolute Menge der an die Blutkörperchen nach erfolgter Sensibilisierung gebundenen Ambozeptoren,

a die absolute Menge der im Serum nach erfolgter Sensibilisierung freilebenden Ambozeptoren,

$G = A + a$ die Gesamtmenge der disponiblen Ambozeptoren,

e die Menge der Erythrocyten,

s die Menge des Serums,

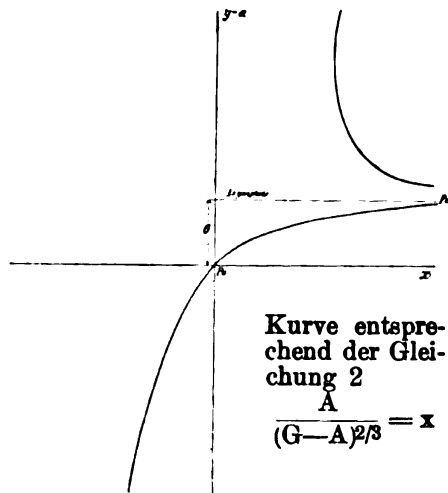
$$\text{so folgt, da } C = \frac{A}{e} \text{ und } c = \frac{a}{s} = \frac{G-A}{s} \text{ aus 1)}$$

$$2) \quad \frac{A}{e} = k \cdot \frac{(G-A)^{2/3}}{s^{2/3}} \text{ oder } \frac{A}{(G-A)^{2/3}} = k \cdot \frac{e}{s^{2/3}} = x$$

Bei konstanter Serummenge (s) ist somit $\frac{A}{(G-A)^{2/3}}$ proportional der Erythrocytenmenge.

1) Nach einer späteren gefl. Mitteilung des letztgenannten Herrn glaubt dieser das Phänomen doch als Erster beobachtet zu haben.

Die Gleichung 2 entspricht einer Kurve 5. Ordnung, von der die nebenstehende Figur einen Spezialfall zur Darstellung bringt¹⁾. Da im vorliegenden Falle A stets positive Werte hat, die kleiner sind als G,



so kommt nur der Kurvenverlauf zwischen P_0 und P_∞ in Betracht. Man ersieht aus diesem Kurventeil, daß bei ansteigendem x der Wert für $A = y$ konstant zunimmt oder daß, mit Worten ausgedrückt, nach dem Gesetz von Arrhenius bei Vermehrung der Erythrocytenmenge in Proben mit gleichviel Serum die Menge der an die Erythrocyten gebundenen Ambozeptoren immer nur zunehmen, niemals abnehmen kann.

Auf den Widerspruch, der hier mit meinen Versuchsergebnissen vorzuliegen scheint, wird unten noch zurückgekommen werden.

II. Der hämolytische Effekt bei wechselnder Konzentration und Menge der Immunkörper.

Wie schon erwähnt, lehrt Arrhenius, daß der Vorgang bei der Absorption hämolytischer Ambozeptoren durch Blutkörperchen demselben Gesetze folgt, wie die Verteilung eines löslichen Stoffes zwischen zwei Lösungsmitteln. Hieraus würde folgen, daß ceteris paribus die Sensibilisierung der Erythrocyten von der Konzentration des verwendeten Immunserums abhängig und mit ihr veränderlich (nicht ihr proportional) sein müsse. Zum gleichen Ergebnis gelangt man durch Diskussion der oben angegebenen Formel, die nach Arrhenius für den Vorgang der Bindung von Agglutininen wie von Hämolsinen an das Antigen gilt, denn sie läßt sich umwandeln in:

$$\frac{A}{(G-A)^{2/3}} = \gamma^{2/3} \cdot \frac{k \cdot e}{G^{2/3}}$$

wobei (wie oben) A die Menge der verankerten Ambozeptoren (nach dem Versuche), G die Gesamtmenge der verfügbaren Ambozeptoren, γ die Konzentration der Ambozeptoren im Serum vor dem Versuche, e die Menge der Erythrocyten und k eine Konstante bedeuten.

Einige im Laufe meiner Studien gemachte Erfahrungen schienen damit nicht wohl vereinbar; ich ging deshalb auch dieser Frage in besonderen Experimenten nach. Keineswegs wollte und konnte ich damit das überaus schwierige Thema der quantitativen Wechselbeziehungen im hämolytischen Experiment etwa erschöpfend behandeln und allgemeine Formeln für die hier geltenden Gesetze ausfindig machen; meine Absicht war nur, auf wenig beachtete, für die praktische hämolytische Technik dennoch bedeutsame Umstände und Fehlerquellen hinzuweisen.

Das zu den folgenden Experimenten dienende System war wieder das oben angegebene: Hammelerythrocyten, inaktives Hammelblutimmunserum vom Kaninchen und Meerschweinchen, wobei wieder solche

1) Die Konstruktion verdanken wir der Güte des Herrn Prof. Dr. Karl Döhle-mann in München.

Meerschweinchensera ausgeschlossen wurden, die an und für sich Hammelerythrocyten in irgend merklicher Menge lösten. Antigen, Ambozeptor und Komplement ließen sich derart aus isolierten Lösungen (bezw. Aufschwemmungen) in beliebigem Verhältnis mengen. Zahlreiche frühere Versuchsreihen mit Hammelserum als Komplement ergaben keine konstanten und befriedigenden Resultate, weil hierbei agglutinierend wirkende hohe Dosen von Immunserum erforderlich waren. Ich sehe von diesen Serien daher vollkommen ab. Die Erythrocyten wurden in der üblichen Weise sensibilisiert ($\frac{1}{2}$ Stunde bei 38° C); hierauf wurden die Proben zentrifugiert, das Serum entfernt, der Erythrocytenbrei einmal in physiologischer Kochsalzlösung gewaschen, mit dem komplementhaltigen Serum versetzt und warm digeriert (2 Stunden bei 38° C). Die Ermittlung des hämolytischen Effektes geschah wieder durch Bestimmung der im Blutkörperreste enthaltenen Hämoglobinmenge und Berechnung der durch die Hämolyse frei gewordenen Hämoglobinmenge (Subtraktion jenes Wertes vom Hämoglobinwerte der in der Kontrollprobe unverändert gebliebenen gesamten Blutkörperchenmasse).

In allen folgenden Versuchen wurde eine konstante Menge von gleichem Erythrocytenbrei angewandt (Hämoglobinmenge entsprechend 1,80 Sahli-Einheiten) und ebenso eine konstante Menge von Meerschweinchensera als Komplement (0,005 ccm). Variiert wurde lediglich die Menge, bezw. die Konzentration des sensibilisierenden Immunserums oder aber beides, wie noch näher anzugeben.

Serie A.

In dieser Serie wirkten auf die Erythrocyten konstante Volumina von sukzessive stärker verdünnten Immunserumlösungen. Von den drei in Betracht kommenden Größen: Volumen der sensibilisierenden Lösung (v), Konzentration dieser Lösung an Immunkörpern (c), Gesamtmenge der in Reaktion tretenden Immunkörper (i) blieb hier die erstgenannte konstant; c und i nahmen sukzessive und parallel ab.

	I	II	III	IV	V
Die Sensibilisierung der konstanten Erythrocytenmenge wurde bewirkt durch					
n ccm	0,2 ccm	0,2 ccm	0,2 ccm	0,2 ccm	0,2 ccm
eines Immunserums in der Verdünnung von	$\frac{1}{10000}$	$\frac{1}{20000}$	$\frac{1}{30000}$	$\frac{1}{40000}$	$\frac{1}{50000}$
Es war somit					
das Volumen der sensibilisierenden Lösung	v	v	v	v	v
die Konzentration der Immunkörper	c	c/2	c/3	c/4	c/5
die Gesamtmenge der verfügbaren Immunkörper	i	i/2	i/3	i/4	i/5
Der hämolytische Effekt war in den einzelnen Versuchen folgender:					
1) Meerschweinchensera a	1,45	1,15	0,80	0,65	0,50
2) " b	1,25	0,75	0,65	0,55	0,35
3) " c	1,15	0,45	0,35	0,25	0,25
4) " d	1,75	1,30	0,80	0,50	0,40
5) " e	1,50	0,95	0,65	0,40	0,15
Lösungseffekt beobachtet (Summe)	7,10	4,60	3,25	2,35	1,65
Lösungseffekt berechnet	8,25	4,13	2,75	2,06	1,65

Wie insbesondere aus der Summe der Lösungseffekte in den einzelnen Versuchen ersichtlich wird, nahm der Lösungseffekt bei dieser Serie in den Proben I--V ab, und zwar durchschnittlich annähernd proportional der Konzentration des Serums und damit auch proportional der Gesamtmenge der verfügbaren Ambozeptoren. Unter der Voraussetzung einer solchen Proportionalität sind in der letzten Horizontalreihe der Tabelle die zu gewärtigenden Werte berechnet (wobei der Effekt in der Probe V = 1,65 angenommen ist) und man ersieht beim Vergleich der beiden letzten Horizontalreihen, daß eine leidliche Uebereinstimmung zwischen diesen berechneten und den beobachteten Werten besteht.

Dieses Ergebnis deckt sich übrigens mit dem Resultate eines zu anderen Zwecken mit anderem System ausgeführten, doch prinzipiell analogen Experimentes. v. Liebermann und v. Fenyvessy haben Schweineblutkörperchen mit konstanten Mengen eines sukzessive verdünnten inaktiven Schweineblutimmunserums sensibilisiert und der Wirkung von Komplement durch 1½ Stunden in der Wärme ausgesetzt. Der Lösungseffekt (Menge des gelösten Hämoglobins) betrug bei Verwendung von

	1/1 Immunserum	1/2 Immunserum	1/4 Immunserum
beobachtet	246	125	55
berechnet	246	123	61

Auch hier trat also die Proportionalität zwischen Lösungseffekt und Immunkörpermenge zutage. Nur wenn die Einwirkungsdauer des Komplementes abgekürzt wurde (auf 1/2 Stunde), wurde diese Proportionalität gestört, und zwar nach Ansicht der Autoren deshalb, weil die Verdünnung die Reaktionsgeschwindigkeit herabsetzt. Bei hinreichend langer Einwirkungsdauer sei die Verdünnung (als solche) ohne Einfluß.

Anders verhält sich nach v. Liebermann und v. Fenyvessy das Komplement; die Wirkung desselben werde durch Verdünnung erhöht. Mit Rücksicht auf diese Abhängigkeit der Komplementwirkung von der Konzentration wurde in allen meinen Versuchen so verfahren, daß die sensibilisierende Lösung erst entfernt und dann das Komplement in stets gleicher Konzentration zugesetzt wurde; anderenfalls wäre das Ergebnis der folgenden Versuchsserien kein so eindeutiges.

(Von einem Zusatze aktiven Serums zu den 1½ Stunden lang bebrüteten Proben ist in der zitierten Arbeit versehentlich nichts erwähnt.)

Auch ein Versuch von Manwaring läßt sich dem mitgeteilten an die Seite stellen: Konstante Mengen von Hammelerythrocyten wurden mit varierten Mengen von Immunserum versetzt, alle Proben wurden durch Zusatz von Kochsalzlösung auf gleiches Volumen gebracht, 3 Stunden lang warm digeriert und über Nacht im Eisschrank sedimentiert. In aliquoten Portionen der über dem Blutbrei stehenden Flüssigkeit wurden die frei gebliebenen Ambozeptoren bestimmt und hiernach die Menge der gefundenen berechnet. Manwarings Werte lassen sich, wie folgt, anordnen.

	I ¹⁾	II	III	IV
Immunserumvolumen	v	v	v	v
Immunserumkonzentration	c	c/2	c/5	c/10
Immunkörpermenge	i	i/2	i/5	i/10
Menge der gebundenen Ambozeptoren nach der Beobachtung des Autors	0,84	0,58	0,13	0,08
Dieselbe nach Berechnung	0,84	0,42	0,17	0,08

Um nun in Erfahrung zu bringen, ob die sukzessive Abnahme der Ambozeptorenkonzentration oder die sukzessive Abnahme der in den einzelnen Proben verfügbaren Gesamtmenge an Immunkörpern das für die Abnahme des Lösungseffektes Maßgebende war, wurde in den folgenden Versuchsserien anders verfahren.

Serie B.

In dieser Serie wirkten auf die Erythrocyten Immunserumlösungen gleicher Konzentration in sukzessive zunehmender Menge. Von den

1) Manwaring hat auch noch Proben mit höher konzentriertem Serum angesetzt, die hier nicht aufgenommen wurden, weil dabei offenbar die Grenze des Bindungsvermögens der Blutkörperchen erreicht bzw. überschritten ist. Die gebundene Menge blieb nämlich von einer gewissen Serumkonzentration an annähernd konstant.

besagten 3 in Betracht kommenden Größen blieb hier die Konzentration der Immunkörper (c) konstant, während das Volumen der Lösung (v) und damit die Gesamtmenge der in Reaktion tretenden Immunkörper (i) anstieg.

	I	II	III	IV	V
Die Sensibilisierung wurde bewirkt durch n ccm eines Immunserums in der Verdünnung von Es war somit das Volumen der sensibilisierenden Lösung die Konzentration der Immunkörper die Gesamtmenge der verfügbaren Immunkörper	0,2 ccm $\frac{1}{50000}$ v c i	0,4 ccm $\frac{1}{50000}$ 2v c 2i	0,6 ccm $\frac{1}{50000}$ 3v c 3i	0,8 ccm $\frac{1}{50000}$ 4v c 4i	1,0 ccm $\frac{1}{50000}$ 5v c 5i
Lösungseffekt					
1) Meerschweinchenserum a	0,55	0,95	1,25	1,40	1,55
2) " b	0,45	0,75	0,95	1,05	1,15
3) " c	0,10	0,30	0,60	0,90	1,10
4) " d	0,15	0,40	0,65	0,95	1,15
5) " e	0,25	0,85	1,35	1,70	1,75
6) " f	0,35	0,85	1,05	1,30	1,50
Beobachtet Summe	1,85	4,10	5,85	7,30	8,20
Berechnet unter Voraussetzung, daß er					
proportional i	1,85	3,70	5,55	7,40	9,25
proportional c	1,85	1,85	1,85	1,85	1,85

Serie C.

In dieser Serie wirkten auf die Erythrocyten Immunserumlösungen von sukzessive abnehmender Konzentration in sukzessive steigender Menge. Von den besagten 3 in Betracht kommenden Größen blieb hier die Gesamtmenge der verfügbaren Immunkörper (i) konstant, während das Volumen der Lösung (v) und die Konzentration (c) reziprok anstieg bzw. abfiel.

	I	II	III	IV	V
Die Sensibilisierung wurde bewirkt durch n ccm eines Immunserums in der Verdünnung von Es war somit das Volumen der sensibilisierenden Lösung die Konzentration der Immunkörper die Gesamtmenge der verfügbaren Immunkörper	0,2 ccm $\frac{1}{10000}$ v c i	0,4 ccm $\frac{1}{20000}$ 2v c/2 i	0,6 ccm $\frac{1}{30000}$ 3v c/3 i	0,8 ccm $\frac{1}{40000}$ 4v c/4 i	1,0 ccm $\frac{1}{50000}$ 5v c/5 i
Lösungseffekt					
1) Meerschweinchenserum a	1,55	1,50	1,50	1,50	1,55
2) " b	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25
3) " c	1,20	1,20	1,15	1,10	1,15
4) " d	1,75	1,75	1,70	1,75	1,75
5) " e	1,40	1,35	1,40	1,40	1,35
Beobachtet (Summe)	7,15	7,05	7,00	7,00	7,05
Berechnet unter Voraussetzung, daß er					
proportional i	7,15	7,15	7,15	7,15	7,15
proportional c	7,15	3,58	2,38	1,79	1,43

In den Tabellen zu den Versuchsreihen B und C ist unterhalb des beobachteten Lösungseffektes angegeben, welcher Lösungseffekt bei den Proben II—V zu gewärtigen wäre, wenn jener in der Probe I dem tatsächlich beobachteten entspricht, und zwar

a) unter der Voraussetzung, daß der Lösungseffekt der Gesamtmenge der zur Sensibilisierung verfügbaren Immunkörper proportional ist (vorletzte Reihe), und

b) unter der Voraussetzung, daß der Lösungseffekt der Konzentration der zur Sensibilisierung verwendeten Immunkörperlösung proportional ist (letzte Reihe).

Diese Zahlenreihen beider Tabellen zeigen übereinstimmend, daß die letztere Voraussetzung sicher eine unzutreffende ist. Hingegen stimmen die unter der ersteren Voraussetzung berechneten Werte mit den beobachteten in einer befriedigenden Weise überein, so daß für die angegebene Versuchsanordnung und innerhalb der hier eingehaltenen Proportionsgrenzen gefolgert werden kann:

Der Sensibilisierungseffekt ist unabhängig von der Konzentration des Immunserums (als solcher) und proportional der in der sensibilisierenden Lösung enthaltenen Gesamtmenge an Immunkörpern.

Dieses Ergebnis scheint nach dem oben Angeführten auf den ersten Blick mit Arrhenius' Gesetz unvereinbar. Doch muß hier Folgendes erwogen werden: In meinen Versuchen wurde der Sensibilisierungseffekt bestimmt, und zwar gemessen an der Blutkörperchenlösung, die eine gewisse den sensibilisierten und gewaschenen Erythrocyten zugesetzte Komplementmenge in gewisser Zeit bewirkt. Arrhenius aber (sowie Manwaring, der bei seinen Nachprüfungen übrigens zu ganz abweichenden Ergebnissen gelangte) hatte direkt die Menge der von den Erythrocyten absorbierten Immunkörper ermittelt. Es ist nun durchaus nicht anzunehmen, daß die letztere mit dem Sensibilisierungseffekt in obigem Sinne unter allen Umständen Hand in Hand gehe; es ist vielmehr möglich, daß eine Erythrocytenmasse, die n -mal mehr Ambozeptoren gebunden hat, auf Komplementzusatz in bestimmter Zeit nicht n -mal mehr Hämoglobin frei werden läßt. Möglicherweise ist die Höhe des Komplementzusatzes nebst der Einwirkungsdauer hierauf auch von Einfluß.

Generelle Schlüsse auf wechselseitige Bindungs- und Wirkungsverhältnisse der hämolytischen Haptine zu ziehen, gestattet mein Material nicht — diese Verhältnisse scheinen heute überhaupt noch nicht überblickt und in Gesetze gefaßt werden zu können — doch dürften die gemachten Beobachtungen auf Fehlerquellen der Methodik hinweisen und so der hämolytischen Praxis nutzbar werden.

Literatur.!

- Moro u. Noda, Paroxysmale Hämoglobinurie und Hämolyse in vitro. (Münch. med. Wochenschr. 1909.)
 Fleckseder u. v. Stejskal, Das Zustandekommen von Hemmungsvorgängen im Reaktionskomplex: Erythrocyt, Immunserum, Komplementserum. (Wien. klin. Wochenschr. 1908. No. 14.)
 Arrhenius, Die Anwendung der physikalischen Chemie auf die Serumtherapie. (Arb. a. d. Kaiserl. Gesundheitsamte. Bd. XX. 1904.)
 —, Immunchemie. Deutsch von Finkelstein. Leipzig 1907.
 v. Liebermann u. v. Fenyvessy, Ueber die Wirkung der Verdünnung auf natürliches und künstliches Normal- und Immunserum. (Biochem. Zeitschr. Bd. V. 1907.)
 Manwaring, The absorption of hemolytic amboceptor. (Centralbl. f. Bakt. etc. Abt. I. Orig. Bd. XL. 1906.)

Nachdruck verboten.

Le diagnostic rapide de la rage.

Nouvelle méthode de coloration des corps de Negri.

[Institut d'Hygiène de l'Université de Pise, Prof. A. di Veste.]

Par le Dr. **Filippo Neri**, assistant.

La technique histologique ne manque pas de bonnes méthodes de coloration des corps endocellulaires spécifiques de l'infection rabique, que le Dr. A. Negri a découverts en 1903 et que l'on appelle corps de Negri. (Negri, Volpino, Abba et Bormans, Bertarelli, Bohne, Fasoli, Baschieri, Frothingham¹⁾, Lentz, Van Gieson, Williams, Williams et Lowden.) Par ces méthodes, on peut établir le diagnostic de la rage dans un temps très court, en substituant une recherche micrographique à la longue méthode de l'injection au lapin.

Je me suis décidé à publier ma méthode, attendu qu'elle relève d'une nouvelle propriété des corps de Negri, démontrée par moi²⁾, c'est-à-dire le pouvoir iodorésistant. J'ai trouvé en effet que l'iode exerce une action mordénçante sur ces corps, qui pour cela prennent la coloration de Gram.

En m'appuyant sur cette grande affinité des corps de Negri pour l'iode, j'ai eu l'idée d'en faire un procédé de mordénçage au profit du diagnostic rapide de la rage.

Je commençai par traiter les coupes ou les frottis de substance cérébrale par la solution de Lugol, avant leur coloration; mais j'ai échoué dans ces épreuves. On n'obtient de bonnes préparations qu'en ajoutant directement le Lugol à la solution aqueuse d'éosine.

Après des essais, je suis parvenu à préparer des liquides colorants de composition bien définie et à réaliser, par leur emploi, une méthode rapide et sûre, applicable à la coloration autant des frottis que des coupes.

Voici ma solution mordénçante d'éosine:

Éosine	g 1,0
Iode	" 0,1
Iodure de potassium	" 2,2
Eau distillée	c. c. 100,0

La préparation de cette éosine iodée est très simple. On dissout d'abord g 0,1 d'iode et g 0,2 d'iodure de potassium dans la quantité la plus petite d'eau distillée et l'on dilue à 50 c. c. cette solution iodoiodurée. D'autre côté on dissout 1 g d'éosine en 50 c. c. d'eau distillée; on mélange ces deux solutions à froid; on filtre; on conserve en bouteille à l'éméri.

Diverses marques d'éosine essayées m'ont donné toutes de bons résultats: ma préférence est pour la marque B de Grübler.

L'éosine iodée préparée comme on le vient de dire, est un liquide tout à fait limpide, d'une nuance quelque peu plus foncée que la solution simple d'éosine de même titre. Mon éosine iodée se conserve à merveille pendant plusieurs mois.

1) Cité par Williams et Lowden, l. c.

2) *Iodoresistenza dei corpi di Negri e suo significato.* (Annali d'Igiene sperimentale. 1909.)

Je viens enfin au procédé que je suis ordinairement pour le diagnostic rapide de la rage. Ayant préparé la corne d'Ammon du cerveau à examiner, on emporte, avec des pinces recourbées, la mince bande de substance blanche qui couvre la couche grise très riche en cellules pyramidales, qui donnent, comme on sait, les plus belles inclusions de corps de Negri. On porte au bord d'une lamelle bien propre un tout petit morceau de cette substance grise, arraché à l'aide de la même pince, on l'étale en couche très mince, en s'aidant du bord d'une lame porte-objet, et aussitôt après (il n'importe pas que le frottis soit séché) on plonge la lamelle dans l'alcool absolu. Dans quelques minutes, la préparation est fixée, et on peut, sans dommage, conserver les lamelles dans le même alcool en boîte fermée pendant plusieurs heures, et même pendant quelques jours.

La méthode des frottis, introduit dans l'étude du système nerveux central par Ewing¹⁾, à l'occasion de ses études sur les cellules ganglionnaires, a été ensuite appliquée, avec quelques modifications, au diagnostic de la rage par Williams, Williams et Lowden, Baschieri, Frothingham, Negri.

Selon mon expérience, moi aussi je trouve cette méthode très pratique: les cellules nerveuses gardent, dans les frottis, leur forme et la localisation caractéristique des corps de Negri.

La méthode des frottis suffit à elle seule pour le diagnostic lorsqu'elle donne un résultat positif; mais il n'en est rien lorsque l'examen des frottis est négatif. Je crois qu'on ne doit pas négliger dans ce cas la méthode des coupes. De cette nécessité j'ai eu tout récemment une épreuve éclatante. J'examinais le cerveau d'un chien qui venait d'être tué, après avoir présenté pendant trois jours des symptômes suspects et mordu plusieurs personnes.

J'en étais alors aux premiers essais de ma méthode de coloration: ayant apprêté de nombreux frottis de corne d'Ammon, j'appliquai ma méthode en même temps que celle de Baschieri²⁾, dont j'avais obtenu précédemment plusieurs fois de bons résultats. Je ne pus observer que de très rares formes suspectes, très difficiles à identifier comme corps de Negri, et c'est pourquoi je m'empressai à faire suivre la méthode des coupes, par laquelle je parvins à démontrer nettement des corps de Negri, quoique très rares et très petits. L'infection du lapin confirma les données de l'observation micrographique.

En cas semblables, il est convenable d'employer l'inclusion rapide à la paraffine selon Henke et Zeller (cfr. Schmorl). On porte de petits morceaux de corne d'Ammon dans un vase bien clos avec de l'acétone pur: la quantité d'acétone nécessaire est de 25 fois environ le volume des morceaux à fixer. On obtient la fixation et le durcissement

1) Cité par Williams, l. c.

2) Résumé de la méthode de Baschieri:

1. Etalement sur lamelle.
2. Fixation dans l'alcool absolu pendant 2'—3'.
3. Colorant pendant 5' (un temps plus long n'a pas d'inconvénient) dans la solution suivante: éosine (spirituslöslich Grübler) g 1; alcool absolu c. c. 100; acide acétique glacial c. c. 0,3; dissoudre à chaud; filtrer après refroidissement.
4. Lavage à l'eau pendant 10"—20".
5. Coloration (1') dans une solution aqueuse de bleu de méthylène 0,5 %.
6. Lavage à l'eau pendant 10"—20".
7. Différenciation dans l'alcool 95° pendant 30"—40".
8. Alcool absolu, xylol, baume.

dans une heure et on se hâte de passer directement les morceaux dans le bain de paraffine (50°C) à 58°C , pour l'inclusion. L'acétone (point d'ébullition 56°C) s'évapore rapidement. Au bout de deux heures l'imbibition des morceaux par la paraffine est complète, et la pièce, bien orientée, est coulée avec sa paraffine chaude, dans un moule quelconque. On coupe la pièce au microtome et l'on étale les coupes sur les lamelles à l'aide de l'eau distillée tiède. On peut donc, au bout de quatre à cinq heures, apprêter des coupes.

Les coupes (c'est de même pour les frottis), passées de l'alcool à l'eau, sont colorées, pendant dix minutes à froid, dans l'éosine iodée: un plus long séjour dans cette solution n'a pas d'inconvénient. Après lavage soigneux de la lamelle à l'eau distillée, la préparation, fortement rose, est colorée pendant cinq minutes dans la solution aqueuse 1‰ de bleu de méthylène: un séjour trop prolongé dans ce liquide colorant (au delà de 10') est nuisible à la bonne différenciation. On lave rapidement à l'eau distillée. La préparation présente à ce moment une teinte bleuâtre avec une nuance rouge. On porte la lamelle dans un bain d'alcool 95° , deux fois renouvelé, en rinçant jusqu'à perte de couleur. L'alcool 95° agit comme différenciateur en emportant l'excès d'éosine et de bleu de méthylène. Les préparations bien différenciées se présentent d'un beau rose, avec une faible nuance bleu. La différenciation achevée, il ne reste que deshydrater, éclaircir par le xylol et monter au baume de Canada dissous dans le xylol.

On voit au microscope les corps de Negri se distinguer de tout autre élément à cause de leur teinte rouge violacée brillante qui se détache du bleu pâle du protoplasma cellulaire et du bleu foncé des noyaux et des nucléoles. Les globules rouges du sang prennent à leur tour le rouge de l'éosine, mais leur teinte vire au rose et est beaucoup moins intense que le rouge violacé brillant des corps de Negri. Cette différence de nuance et d'intensité de coloration est si marquée, qu'il n'y a pas possibilité de confusion, même en observant des corps de Negri devenus extracellulaires à cause du déchirement de la cellule qui les contenait. Cela arrive (c'est évident) plus fréquemment avec les frottis qu'avec les coupes. Le fond de la préparation est colorée faiblement en rose.

Dans les préparations non complètement différenciées il se peut que le bleu de méthylène reste adhérent à des corps de Negri et masque la teinte rose de l'éosine; mais lorsque la différenciation est parfaite, le bleu de méthylène reste fixé seulement sur les corpuscules basophiles contenus dans les vacuoles des corps de Negri.

Avec la coloration à l'éosine iodée, la structure vacuolaire des corps de Negri résulte très évidente. Mes observations n'ajoutent rien à ce que le Dr. Volpino et d'autres ont publié à ce sujet: pour cela je m'en passe de toute discussion touchant la structure de ces corps. Je crois toutefois intéressant de remarquer que les vacuoles des corps de Negri ne se sont pas toujours présentées à mes observations avec des corpuscules basophiles: on en voit quelques-uns tout à fait vides.

La méthode à l'éosine iodée et bleu de méthylène présente donc l'avantage d'une exquise électivité de coloration des corps de Negri, qui se distinguent soit par l'intensité, soit par la nuance de leur teinte.

Resumé de la méthode.

- 1°. Frottis fixés dans l'alcool absolu ou coupes apprêtées selon la méthode Henke et Zeller.
- 2°. Coloration pendant dix minutes dans l'éosine iodée.
- 3°. Lavage soigneux à l'eau distillée.
- 4°. Coloration pendant 5' dans le bleu de méthylène aqueux 1^{0/100}.
- 5°. Lavage rapide à l'eau distillée.
- 6°. Différenciation dans l'alcool 95°.
- 7°. Deshydratation, éclaircissement, montage.

Travaux cités.

- Abba, F., et Bormans, A., Sur le diagnostic histologique de la rage. (Ann. de l'Inst. Past. 1905. p. 49—61.)
- Baschieri, A., Sulla diagnosi rapida della rabbia. (Soc. Med.-Chir. di Bologna, 24. VI. 1906.)
- Bertarelli, E., Ricerche ed osservazioni sperimentali sulla rabbia. (Riv. d'Ig. e San. pubbl. 1905. p. 774—795.)
- Bohne, A., Beitrag zur diagnostischen Verwertbarkeit der Negrischen Körperchen. (Zeitschr. f. Hyg. 1905. p. 87.)
- Fasoli, G., Sulla colorazione dei corpi di Negri nella infezione rabida. (Policlinico, Sez. prat. Vol. XI. 1904. p. 334.)
- Lentz, O., Ein Beitrag zur Färbung der Negrischen Körperchen. (Centralbl. f. Bakt. etc. Abt. I. Orig. Bd. XLIV. 1907. p. 374—378.)
- Negri, A., Sulla etiologia della rabbia. La diagnosi della rabbia in base ai nuovi reperti. (Boll. della Soc. Med.-Chir. di Pavia. 14. VII. 1903.)
- — Contributo allo studio dell'etiologia della rabbia. (Ibid. 27. III. 1903.)
- — Zur Aetiologie der Tollwut. Die Diagnose der Tollwut auf Grund der neuen Befunde. (Zeitschr. f. Hyg. 1903. p. 507 u. 520.)
- — Sulla morfologia e sul ciclo evolutivo del parassita della rabbia. (Rendiconti Acc. Lincei, Sez. Scienze fisiche e naturali. Vol. XXI. 5. V. 1907. p. 800—809.)
- Neri, F., Iodoresistenza dei corpi di Negri e suo significato. (Ann. d'Ig. sper. 1909.)
- Schmorl, G., Die pathologisch-histologischen Untersuchungsmethoden. Leipzig 1907. p. 66 et 325.
- Van Gieson, J., The smears method and frozen sections in the diagnosis of rabies. (Collected Studies from the Laboratory of Health. New-York. Vol. 1. 1905. p. 12—19.)
- Volpino, G., Sulla diagnosi istologica della rabbia. (Riv. d'Ig. e San. pubbl. 1904. p. 20—29.)
- — Sulla struttura dei corpi descritti da Negri nella rabbia. (Arch. Sc. Med. 1904. p. 153—169.)
- — Sulla struttura dei corpuscoli contenuti nell'interno dei corpi di Negri. (Riv. d'Ig. e San. pubbl. 1904. p. 843—848.)
- Williams, A. W., Negri bodies with special reference to diagnosis. (Collected Studies from the Laboratory of Health, New-York. Vol. I. 1905. p. 3—6.)
- et Lowden, M., The etiology and diagnosis of Hydrophobia. (Ibid. Vol. II. 1906. p. 13—49.)

Nachdruck verboten.

Ueber ein neues Verfahren zum Nachweis von Indol auf Nährsubstraten.

[Aus der medizinischen Klinik der Kgl. Universität Pavia
(Leiter: Prof. C. Forlanini).]

Von Dr. G. Morelli.

Erst vor kurzem habe ich in der Kgl. medizinisch-physikalischen Akademie zu Florenz¹⁾ eine vorläufige Mitteilung gemacht über eine neue Methode zum Nachweis des Indols zu bakteriologischen Zwecken. Dieselbe beruht darauf, daß Oxalsäure bei Gegenwart von Indol eine deutliche rote Färbung erzeugt. Da nun Indol eine flüchtige Substanz ist, so dachte ich, dasselbe in der über dem Nährboden liegenden Atmosphäre erfolgreich aufsuchen zu können. Das hierzu angewandte Verfahren habe ich damals folgendermaßen angegeben²⁾: „In eine warm-gesättigte Oxalsäurelösung wird ein Streifen Fließpapier getaucht. Beim Erkalten bleibt derselbe mit fester Oxalsäure gänzlich belegt, da dieser Körper in der Kälte weniger löslich ist als in der Wärme. Der — sterilisierte — Papierstreifen wird dann in der Atmosphäre des Reagensglases aufgehängt. Durch Einwirkung des von den Mikroorganismen erzeugten Indols nimmt die anfangs weiße Oxalsäure allmählich eine rote Färbung an, die schließlich zu einer ganz ausgesprochenen wird, wenn die Säure durch längere Zeit mit den Dämpfen in Berührung bleibt. Behufs leichterer Ausführung erscheint es hierbei angezeigt, die Streifen des distalen Endes spitzwinkelig umzubiegen. Die dadurch entstandene Knickung dient dazu, den Streifen am Rande des Röhrchens vor Schließung desselben festzuhalten.“

Ich habe seitdem das Verfahren auf einem ausgedehnteren Gebiet zur Anwendung gebracht, indem ich mit verschiedenen Mikroorganismen experimentierte, und habe dabei stets durchaus günstige Resultate erzielt.

Die hierzu benutzten Nährböden waren — unter den flüssigen —: Bouillon (gewöhnlich, traubenzuckerhaltig und mit Liebig'schem Fleisch-extrakt versetzt), Peptonwasser, Gelatinelösung — sowohl gewöhnlich, als auch mit Ammoniaksalzen versetzt —, Plasmonlösung, Milch. Unter den festen: Agar — gewöhnlich und traubenzuckerhaltig —, gewöhnliche Gelatine, Kartoffeln. Ueberdies versuchte ich auch das Achalmesche Substrat mit in physiologische Lösung gebrachten Würfeln von geronnenem Eialbumin.

Die hiermit kultivierten Mikroorganismen waren: *Bacterium coli* verschiedener Herkunft, *Cholera vibrio*, *Vibrio Metschnikoff*, *Vibrio Massaua*, *Vibrio danubicus*, die gewöhnlichen Mikroorganismen der Fäulnis, *Typhus bacillen*, *Paratyphus A* und *B*, *Bacillus faecalis alcaligenes*, *Bacillus enteritidis* (Gärtner), *Streptococcus pyogenes*, *Sarcinae*.

Sowohl bei positiver, als auch bei negativer Indolreaktion ist es mir möglich gewesen, für flüssige Substrate meine Methode mit den klassischen, bisher bekannten zu vergleichen, und stets habe ich — je nach

1) Sitzung vom 23. Januar 1908.

2) *Rivista critica di Clinica medica*. 1908. No. 5.

Beschaffenheit der dazu verwendeten Nährböden — eine positive Reaktion für indolbildende, eine beständig negative hingegen für die anderen bekommen.

Als vorzüglich zur Erzielung einer raschen Indolreaktion erweisen sich die peptonhaltigen Substrate. Langsamer — aber doch noch immer deutlich — erfolgt besagte Reaktion bei allen übrigen, oben erwähnten, mit Ausnahme der gewöhnlichen Gelatine in physiologischer Lösung. Dies ist das einzige Substrat, wo ich trotz ausgiebiger Entwicklung von Mikroorganismen — namentlich der obengenannten Vibrionen — niemals eine Indolreaktion zu erzielen vermochte, auch nicht durch Versetzen des Substrats mit Ammoniaksalzen. Das Unvermögen der Gelatine, Indol zu bilden, hat zur Folge, daß auch Kulturen auf Gelatine dasselbe nur verzögert liefern. Kulturen in Peptonwasser bzw. Peptonbouillon können schon nach wenigen Lebensstunden eine deutliche Reaktion geben, häufig auch dann, wenn die klassische, von Salkowski — selbst mit den allerneuesten Modifikationen angewendet — und die von Ehrlich auf die Gegenwart dieses Produktes noch gar nicht hindeuten.

Eine recht deutliche Reaktion ist die auf Agarsubstraten: Häufig gibt eine Kultur, wo beim Besäen ein mit Oxalsäure durchtränkter Papierstreifen aufgehängt worden, schon nach 12 Stunden eine ausgesprochene Reaktion. Ebenso deutlich ist nach wenigen Tagen die Rötung der Oxalsäure auf Kartoffeln, auf Achalmeschem Substrat. Selbstverständlich ist dies nur bei Mikroorganismen der Fall, welche die Fähigkeit besitzen, die Eiweißstoffe direkt anzugreifen und dieselben zur Bildung des Indols zu spalten.

Aus den mitgeteilten Ergebnissen glaube ich, auf den technisch-bakteriologischen Nutzen des von mir vorgeschlagenen Verfahrens schließen zu dürfen. Die zur Ermittlung des Indols üblichen Methoden sind keine für diese Substanz charakteristischen, so Campecheholz und die Salkowskische Reaktion. Diese letztere beruht auf den durch salpetrige Säure zur Entwicklung gebrachten Farben. Bekanntlich ist jedoch die Möglichkeit nicht ausgeschlossen, daß diese Säure Färbungen hervorruft, welche die charakteristische Reaktion verhehlen bzw. vortäuschen können. Es ist naheliegend, daß dieses Verfahren — bei einem zusammengesetzten, größtenteils noch unbekannten Boden angewendet, wie eben derjenige ist, wo sich Mikroorganismen vermehrt haben — kein durchaus sicheres bzw. empfindliches sein kann. Anders ist es mit meiner Methode, bei der zu einer — wie ich glaube — absoluten Spezifität noch der Umstand hinzukommt, daß die Reaktion durch Einwirkung der Indoldämpfe — d. i. mit einem im Zustande der allergrößten Reinheit befindlichen Stoffe — vor sich geht.

Vorteilhaft ist hierbei noch die Möglichkeit, die Bildung des Indols auch auf festen Nährböden recht bequem zu beobachten. Es ist bereits erwähnt worden, daß auf geeigneten Substraten — z. B. Agar — die Reaktion eine ebenso rasche ist wie auf flüssigen, denn obwohl auf denselben die Vermehrung der Mikroorganismen eine schwächere und deren Metabolismus ein geringerer ist, so wird doch die Empfindlichkeit der Reaktion dadurch gesteigert, daß das Indol im Nährboden nur schwer löslich ist und sich daher in größerer Menge in der darüberliegenden Atmosphäre verbreiten muß.

Oft geschieht es aber, und dies habe ich bei manchen systematischen Untersuchungen deutlich wahrgenommen, daß im Substrat nur wenige

indolbildende Substanzen vorhanden sind, so daß bei Anwendung der üblichen Methoden dieser Stoff nicht anzutreffen ist, und zwar entweder, weil man denselben zu früh, d. i. vor Eintreten der erforderlichen Spaltung, oder zu spät, d. i. wenn das gebildete flüchtige Indol bereits gänzlich verschwunden ist, aufsucht. Dies kommt bei Anwendung der mit Oxalsäure belegten Papierstreifen nicht vor; dieselben behindern die normale Ausbildung der Kolonien in keiner Weise und können deshalb gleich bei Einleitung des Verfahrens angebracht werden. Auf anderen Nährböden, z. B. auf dem Achalmeschen, wo die physiologische Lösung keine Indol zurückhaltenden Stoffe enthält, gelingt es mit Hilfe des von mir empfohlenen Verfahrens leicht, dasselbe aufzufinden, während bei Anwendung der sonst üblichen Methoden dies nur schwer, ja häufig gar nicht gelingen will.

Der größte Vorteil meines Verfahrens dürfte meiner Ansicht nach darin bestehen, daß dasselbe gestattet, die Indolbildung zu verfolgen, ohne die Kultur deshalb zerstören zu müssen. Auf diese Weise wird es möglich, die weitere Entwicklung zu beobachten und, durch Einlegung frischer Papierstreifen, zu ermitteln, ob die Spaltung der Peptone etwa aufgehört hat. Man wird somit keine Gefahr laufen, die Kultur zu früh, d. h. dann zu zerstören, wenn eine Indolbildung doch noch möglich wäre — bekanntlich ist die hierzu erforderliche Zeit eine mehr oder weniger geraume. So kann z. B. *Bacterium coli* diese Substanz erst nach 6—7 Tagen oder noch später liefern.

Dazu kommt aber noch, soviel ich festgestellt, die Spezifität der Reaktion, sowie die größere Empfindlichkeit derselben den bisher bekannten Reaktionen gegenüber, Bedingungen, die wohl dazu geeignet erscheinen, etwaige Zweifel über Bildung oder Nichtbildung von Indol bei alten bzw. an überhaupt kein Indol bildenden mikroorganismenreichen Kulturen zu benehmen.

Ohne mich jetzt in nähere Besprechungen, die erst in einer späteren Arbeit Platz finden sollen, einzulassen, kann ich im Gegensatz zur allgemein herrschenden Anschauung noch hinzufügen, daß verschiedene Mikroorganismen (z. B. *Vibrio Metschnikoff*) Indol aus der Milch bilden können, einem Nährboden, bei dem durch andere Methoden der Nachweis nicht möglich ist. Und wie für die Milch, so gelang es mir, die Indolreaktion auch bei traubenzuckerhaltigen Substraten hervorzurufen, d. h. bei solchen, wo überhaupt eine Indolbildung für gar nicht möglich gehalten wurde. Eine recht deutliche Reaktion ist aber auch indirekt deshalb von Vorteil, weil sie den Beweis liefert, daß der ganze im Nährboden enthaltene Traubenzucker zerstört ist.

Es ist wohl kaum nötig, noch schließlich hervorzuheben, daß durch dieses Verfahren die Möglichkeit gegeben ist, die Gegenwart von Indolverbindungen in jedem Nährboden, wo Indol vorhanden ist, zu enthüllen, wenn nur die Temperatur die zur Verdunstung desselben erforderliche Höhe erreicht hat (Faeces, Eiter usw.).

Inhalt.

- Börnstein, Felix**, Ueber Anaphylaxie durch Fütterung gegenüber Fütterung, p. 374.
- Galli-Valerio, Bruno**, Recherches expérimentales sur la rage des rats, p. 318.
- Hadley, Philip B.**, Studies in avian coccidiosis. I. White diarrhea of chicks. II. Roup of fowls, p. 348.
- Hoefler, P. A.**, Einige Beobachtungen an Spirochaete recurrentis (Obermeieri). Bemerkungen zu der Arbeit von Dr. Richard Gonder: „Die Stellung der Spirochäten unter den Protisten“ in Bd. XLIX. Heft 2 des Centralbl. f. Bakt. etc., p. 345.
- Klimenko, W. N.**, Morphologie und Biologie des Keuchhustenbacillus, p. 309.
- Kregenow, Curt**, Ueber die Filtration des Staupecontagiums, p. 326.
- Lebram, Fritz**, Ratinbacillus und Bacillus enteritidis Gärtner, p. 315.
- Michailow, Sergius**, Zur Frage über die Veränderungen des Nervensystems bei der asiatischen Cholera beim Menschen, p. 296.
- Morelli, G.**, Ueber ein neues Verfahren zum Nachweis von Indol auf Nährsubstraten, p. 413.
- Neri, Filippo**, Le diagnostic rapide de la rage. Nouvelle méthode de coloration des corps de Negri, p. 409.
- Noda, Saburo**, Ueber das Mischungsverhältnis bei hämolytischen Proben, p. 401.
- Rosenberger, Randle C.**, The presence of tubercle bacilli in the circulating blood in tuberculosis, p. 295.
- Sacharoff, G. P.**, Ueber die Milzbrandimmunität des Hundes, p. 353.
- Sauerbeck, Ernst**, Sarcina mucosa nova species, p. 289.
- Schmidt, Th.**, Untersuchungen über Hämolyse bei Coli- und anderen Darmbakterien, p. 359.
- van der Sluis, Y.**, Ueber die Abtötung der Tuberkelbacillen in natürlich infizierter Milch und über die Pasteurisierung der Milch, p. 378.

Die Redaktion des „Centralblatts für Bakteriologie und Parasitenkunde“ richtet an die Herren Mitarbeiter die ergebene Bitte, etwaige Wünsche um Lieferung von besonderen Abdrücken ihrer Aufsätze entweder bei der Einsendung der Abhandlungen an die Redaktion auf das Manuskript schreiben zu wollen oder spätestens nach Empfang der ersten Korrekturabzüge direkt an den Verleger, Herrn Gustav Fischer in Jena, gelangen zu lassen.

Nachdruck verboten.

Ein Fall von Cholera asiatica mit vorherrschender Affektion der Leber und der Gallengänge.

Von G. S. Kulescha,

Prosektor am St. Maria-Magdalenenkrankenhaus zu St. Petersburg.

Das Auftreten von Choleraerkrankungen im Sommer des Jahres 1907 in Samara und Astrachan und ihre Verbreitung in den Gouvernements an der Wolga weckte die Befürchtung, daß die Cholera nach Petersburg eingeschleppt werden könnte. Diese Befürchtung wuchs mit dem Vordringen der Cholera nach dem Westen und dem Norden, und erreichte ihren Höhepunkt, als die Krankheit in Nischnij-Nowgorod, Jaroslawlj und Rybinsk ausbrach.

Im Laufe dieser Zeit erweckten einige Fälle von akut verlaufenden Intestinalerkrankungen den Verdacht, es könnte die Cholera sein; sie wurden bakteriologisch untersucht, aber alle diesbezüglichen Analysen ergaben ein negatives Resultat. Dieses und hauptsächlich auch das Eintreten der Fröste, sowie die Verminderung der Zahl der Cholerafälle allerorten ließ die Möglichkeit einer Einschleppung der Cholera nach Petersburg weniger wahrscheinlich erscheinen, und so wurde die Aufmerksamkeit, die man ihr schenkte, immer schwächer.

Indessen wurden im Monat Oktober und November in der Stadt Fälle von Gastroenteritis beobachtet, von denen einige mit dem Tode endigten.

Da die bakteriologische Analyse für die Aerzte, welche diese Fälle behandelten, nicht obligatorisch war und nur dann von ihnen ausgeführt wurde, wenn es ihnen wünschenswert erschien, so blieb der Charakter dieser Erkrankungen in vielen Fällen unaufgeklärt.

Im November fand solch ein Fall im St. Maria-Magdalenenkrankenhaus statt.

Die Kranke, eine verheiratete Frau von 35 Jahren, im 9. Monate der Schwangerschaft, kam am 30. Okt. mit Symptomen von akuter Gastroenteritis, welche von Anzeichen bedeutender Herzschwäche begleitet wurde, ins Krankenhaus. Die Temperatur war die ganze Zeit subnormal ($35,5^{\circ}\text{C}$). Am 3. Tage nach ihrem Eintritt ins Krankenhaus starb die Kranke (am 2. Nov.). Die Sektion zeigte eine merkliche Eindickung des Blutes und der serösen Flüssigkeiten. Die Serosa der Gedärme war trübe, die Darmschlingen von zähem, klebrigem Exsudat bedeckt. Die Schleimhaut des ganzen Intestinaltraktes katarrhalisch entzündet, in dem Teile, der dem Ileum entspricht, mit diphtherischem Belag bedeckt, welcher sich bald über ganze Flächen verbreitete, bald in kleinen Flecken erschien. Alle inneren Organe stark parenchymatös entartet.

Ich untersuchte den Fall bakteriologisch, konnte aber bei Aussaat aus dem Dünndarm auf Peptonwasser in dem Inhalt der Gedärme keine Choleravibrionen vorfinden. So mußte die Erkrankung, trotzdem ihr klinischer Verlauf und das pathologisch-anatomische Bild, welches sie bot, den Eindruck von Cholera machten, als akute Gastroenteritis bezeichnet werden.

Ganz andere Resultate ergab der zweite Fall. Der Kranke, S. Dubow, 27 Jahre alt, klagte am 4. Nov., beim Eintritt in das Krankenhaus, über Durchfall und Erbrechen, welche schon 5 Tage andauerten.

Der Zustand des Kranken erschien objektiv ziemlich schwer: Eingefallene Augen, schwache Stimme, eingezogener, schmerzhafter Bauch, die Leber kaum fühlbar, wässrige, wiederholte Stuhlentleerungen. Der Puls genügend gut. Von seiten der Lunge und des Herzens waren keine besonderen Veränderungen bemerkbar.

Dieser schwere Zustand dauerte bis zum 8. Nov., darauf erfolgte einige Besserung, das Erbrechen hörte auf, die Bauchschmerzen verschwanden, die Stuhlentleerungen wurden seltener (1—2mal des Tages), blieben aber wässrig, der Kranke bekam Appetit.

So ging es bis zum 18. Nov. Im Laufe dieser Zeit wurden die Darmentleerungen des Patienten zweimal mikroskopisch untersucht und dabei nichts Besonderes gefunden. Eine umfassende bakteriologische Untersuchung der Darmentleerungen wurde bei Lebzeiten des Kranken nicht vorgenommen.

Am 18. Nov. trat Frösteln ein, die Temperatur stieg, in der Lendengegend zeigte sich ein Geschwür, welches später aufbrach. Von diesem Tage an verschlimmerte sich der Zustand des Kranken sehr stark, es trat ein remittierendes Fieber ein, Besinnungslosigkeit, der Durchfall wurde stärker, das Erbrechen kehrte wieder. Am 1. Dez. starb der Kranke bei zunehmender Schwäche.

Die klinische Diagnose lautete: Gastroenteritis ac. Septicaemia.

Bei der Sektion, die ich am 2. Dez. ausführte, ergab sich folgendes:

Der Leichnam eines Mannes von mittlerem Wuchs, regelmäßigem Körperbau und mäßiger Ernährung. Der Leib stark aufgetrieben, seine Wände gespannt, an den Seiten stark ausgeprägte Leichenflecke. Das Herz von den Lungen nicht bedeckt. Im Herzbeutel ungefähr $\frac{1}{2}$ Eßlöffel seröser Flüssigkeit. Das Herz erweitert, das Pericardium trübe, in den Vorhöfen und Ventrikeln lockere Blutgerinnsel. Der Herzmuskel blaß, sehr bröcklig, beim Druck mit dem Finger leicht zerreißbar, von unklarer Struktur und gelblicher Färbung. Die Mitralklappen unverändert, die Aortenklappen mit ungefähr erbsengroßen, fibrinösen, lockeren und leicht zerreißbaren Auswüchsen bedeckt, welche den Eingang in die Aorta verengerten. Nach Entfernung der Auswüchse zeigten sich auf allen drei Klappenteilen runde Perforationen von 0,4—0,5 cm Durchmesser. Die atrioventrikulären und arteriellen Klappen des rechten Ventrikels, das Endocardium und die Intima der Aorta unverändert. Die Lunge beiderseits frei in den Pleuralhöhlen liegend, stark zusammengefallen, besonders im unteren Teile. Das Lungengewebe blutreich und überall luftdurchgängig.

Bei Oeffnung des Abdomens strömte aus ihm Luft heraus. Die Darmschlingen waren stark aufgeblasen, auf dem von Gasen angefüllten Colon eine Perforation ins Peritoneum, welches an dieser Stelle mit wässrigen Fäkalien bedeckt war. Die Dünndarmschlingen mit klebrigem, zähem Exsudat und Fäkalien bedeckt, blutunterlaufen, dunkelbraun gefärbt. Das viscereale Peritoneum trübe, blutunterlaufen, mit fibrinösem Belag. Der Magen erweitert, mit einer kleinen Menge trüber, brauner Flüssigkeit angefüllt. Seine Mucosa akut katarrhalisch entzündet. Die Mucosa der Gedärme überall akut katarrhalisch entzündet, stellenweise blutunterlaufen, die Mittelpunkte solcher Stellen nekrotisiert und leicht ablösbar. Im Colon die ganze Dicke der Wand nekrotisiert, was den Eintritt der Perforation hervorgerufen hatte. Der Darminhalt wässrig und dunkelfarbig. Die Nieren nicht vergrößert, ihre Kapseln lassen sich mit einem Teil der an ihnen haften gebliebenen Rinde leicht abziehen. Das ganze Nierengewebe, mit Ausnahme des unteren Randes der rechten Niere und eines kleinen Abschnittes des oberen und unteren Endes der linken Niere, von grauen Infarkten durchsetzt. Die Milz vergrößert, in ihrer Mitte ein eiteriger, zerfallener Infarkt, dementsprechend die Kapsel nekrotisiert und zerstört. Die Leber vergrößert und hart. Ihre Kapsel trübe, mit fibrinösem Belag. Die Gallenblase erweitert, ihre Kuppel unter dem Rande der Leber hervorstehend, ihr Inhalt dunkel, trübe, flockig.

Beim Zerschneiden der Leber erschienen die größeren Gallengänge erweitert, angefüllt mit flüssigem Eiter, welcher von der Galle gefärbt und mit weichen, lockeren, auch von Gallenpigmenten gefärbten Konkrementen vermischt war. Das Gewebe der Leber anämisch, lehmfarbig, von unklarer Struktur, sehr mürbe.

Der Schädel regelmäßig, die Dura mater leicht abziehbar, die Gefäße mit dickem Blute angefüllt. Die weichen Hirnhäute trübe, etwas ödematös, an den Seiten blutunterlaufen. Das Hirngewebe mürbe, trocken, schmierig, anämisch. In den anderen Organen keine besonderen Veränderungen bemerkbar.

Die pathologisch-anatomische Diagnose lautete:

Gastroenteritis ac., Cholangitis purulenta ac., Endocarditis vv. aortae ulcerosa verrucosa ac., Infarctus ex embolia renum, lienis et intestinorum. Abscessus metastaticus regionis sacralis. Peritonitis perforativa ac. stercoralis. Septicopyaemia.

Soweit die Ergebnisse der Sektion. Auf Grund des klinischen Verlaufes der Krankheit und des pathologisch-anatomischen Bildes, welches

die Sektion ergab, glaubte ich, einen Cholerafall vor mir zu haben, und entschloß mich deshalb, ihn einer bakteriologischen Untersuchung zu unterwerfen.

Da in dem Intestinaltraktus weitverbreitete, von der Infarktbildung hervorgerufene sekundäre Veränderungen vorgegangen waren, so wählte ich als Material zur Aussaat nicht den Darminhalt, sondern den Eiter aus den Krankheitsherden in der Leber, weil ich glaubte, daß sie in engem ätiologischen Zusammenhange mit den Veränderungen im Intestinaltraktus stehen mußten. Ich säte den Eiter aus der Leber auf Peptonwasser. Am nächsten Tage (3. Dez.) hatte sich auf der Oberfläche des Peptonwassers die charakteristische Membran gebildet, welche sich bei der mikroskopischen Untersuchung als fast ausschließlich aus Kommabacillen bestehend erwies. Durch Abimpfung der Membran auf weitere Kölbchen mit Peptonwasser und auf Agarplatten in Petri-Schalen erhielt ich Reinkulturen der Vibrionen.

Die weiteren Untersuchungen bestätigten die Cholernatur des von mir ermittelten Mikroorganismus. Er war von scharf ausgeprägter Kommaform, sehr beweglich, zeigte das typische Wachstum auf Bouillon, Agar, Gelatine. Bei der Agglutinationsprobe benutzte ich ein Serum mit einem Titer von 1:30000, die Reaktion trat bei Verdünnung von 1:1000 bis 1:6000 in Laufe von 1—2 Stunden, bei größeren Verdünnungen (1:10000 bis 1:15000) im Laufe von 24 Stunden ein.

Ich begnügte mich aber nicht mit diesen Untersuchungen, sondern schickte meine Kulturen zur weiteren Kontrolle ins Institut für experimentelle Medizin an Prof. Zabolotny und in das städtische bakteriologische Laboratorium an Dr. Jakowleff. Beide Bakteriologen bestätigten meine Diagnose, und Prof. Zabolotny schrieb mir, daß die von mir ausgeschiedene Kultur sowohl morphologisch, wie auch im Sinne der verschiedenen spezifischen Reaktionen alle Merkmale einer echten Cholerakultur zeige: Charakteristische Kolonien, Wachstum längs dem Stich, Bildung einer Membran, Kommaform, eine endständige Geißel, positive Reaktion bei der Agglutinationsprobe mit Choleraserum, dessen Titer 1:20000 war (in Verdünnungen von 1:1000 bis 1:10000), endlich der Pfeiffersche Versuch. Dies alles brachte Prof. Zabolotny zu dem Schlusse, daß der von mir untersuchte Fall bedingungslos ein Cholerafall war, und daß meine Voraussetzungen zutreffend seien.

Also war die Grundursache vorliegenden Falles zweifellos eine Choleraerkrankung. Nunmehr wäre es interessant, die Komplikationen festzustellen, welche die schwere Septikopyämie herbeiführten, die den Tod zur Folge hatte. Dabei kommt man auf die Frage, ob die Septikämie ausschließlich von dem Choleravibrio hervorgerufen war, oder ob sie von einer anderen Infektion sekundären Charakters herbeigeführt wurde?

Zur Beantwortung dieser Frage habe ich die Leber und die Auswüchse auf den Aortenklappen mikroskopisch untersucht.

Die Untersuchung von Scheibenschnitten aus der Leber zeigte, daß die eiterige Entzündung vornehmlich in den größeren Gallengängen lokalisiert war, während die kleineren Gallengänge und Gallenkapillaren kein eiteriges Transsudat enthielten und nur Ablösung des Epithels und verschiedene Grade seiner parenchymatösen Entartung zeigten. Rings um die Gallenkapillaren, in der Glissonschen Kapsel und in dem Parenchym der Leber selbst bestand eine scharf ausgeprägte zwischenzellige Infiltration. Das Parenchym selbst war stark verändert. Es fanden sich große Flächen von vollständig

nekrotisiertem Gewebe vor, wo die Nekrose solch einen hohen Grad erreicht hatte, daß keine Färbung der Leberzellen mehr möglich war. Auf Schnitten, die mit Karbolfuchsin gefärbt waren, konnte man sehen, daß die Venae centrales der Leberläppchen und die Kapillaren vollständig vollgepfropft waren mit ziemlich dicken und geraden, sehr dem *B. coli* und seinen Anverwandten ähnelnden Bakterien. Dieselben Bakterien fanden sich auch in den Verzweigungen der Venae portae und hepaticae vor, wo sie mit den Formelementen des Blutes vermischt waren. Abgesehen davon, konnten in der Leber auch noch andere Eiterherde beobachtet werden, die nicht mit den Gallenkapillaren in Verbindung standen, sondern anscheinlich metastatischen Ursprungs waren. In diesen Eiterherden und im Eiter der Gallengänge gedieh eine sehr zahlreiche und verschiedenartige bakterielle Flora, in welcher das oben genannte Bakterium die Oberhand behielt, wo aber außer ihm noch ein *Diplococcus* ohne Kapsel und ein dünner fadenförmiger *Bacillus* lebte. Kommaformen fanden sich nur selten vor und waren schwer zu unterscheiden.

Ein ähnliches Resultat ergab die Untersuchung der warzenförmigen Auswüchse auf den Aortenklappen. Diese Auswüchse bestanden fast durchweg aus reinen Diplokokkenkulturen. Nur stellenweise sah man einzelne Anhäufungen von Bacillen und kommaähnlichen Formen.

Alles, was bis jetzt gelegentlich der mikroskopischen Untersuchung der Leber und der Auswüchse auf den Herzklappen gesagt wurde, kann zur Beantwortung der oben aufgestellten Frage dienen: Die Septikämie war vornehmlich durch die sekundäre Infektion und nicht ausschließlich von dem *Cholera vibrio* hervorgerufen. Den Verlauf der Krankheit muß man sich also folgendermaßen vorstellen: Gleichzeitig mit dem *Cholera vibrio* drangen aus dem Intestinaltraktus auch noch andere Mikroorganismen in die Leber. Sie verbreiteten sich, verdrängten den ursprünglichen Krankheitserreger, füllten die Blutgefäße und führten zur Bildung von warzenförmigen Auswüchsen, die, dank ihrer Zerreißbarkeit, zahlreiche Embolien in verschiedenen Organen hervorriefen.

Vorliegender Fall stellt also einen Komplex uns gut bekannter und umfassend untersuchter Erscheinungen dar, welche oft genug bei sekundären Septikopyämien, die nicht selten akute Infektionskrankheiten zu begleiten pflegen, beobachtet werden. Was jedoch die Cholera anbetrifft, so nimmt vorliegender Fall eine wohl ziemlich ausschließliche Stellung ein, und ich konnte in der diesbezüglichen Literatur keine einzige analoge Mitteilung vorfinden. Dies ist freilich auch sehr natürlich. Die die Cholera betreffende Literatur bietet überhaupt sehr wenig kasuistisches Material, teilweise deshalb, weil der entstprechende Stoff selten eine detaillierte Bearbeitung findet, teilweise aber infolgedessen, daß bei dem größten Teile der zeitweise eröffneten Cholerakrankenhäuser keine Prosektoren angestellt sind, die zur Beleuchtung jedes einzelnen Falles beitragen könnten.

Das Interessanteste am vorliegenden Falle waren aber nicht die oben mitgeteilten Komplikationen, sondern die Lokalisation der Cholerainfektion in der Leber und vornehmlich in den Gallengängen, wo der *Cholera vibrio*, trotz dem Vorhandensein von anderen Mikroorganismen, im Laufe eines ganzen Monats zu leben vermochte, und bei der bakteriologischen Untersuchung leicht vorgefunden werden konnte. Diese Tatsache erinnert unwillkürlich an das analoge Verhalten zu den Gallengängen eines anderen, dem *Cholera vibrio* im ätiologischen Sinne nahe verwandten pathogenen Mikroorganismus, ich meine den *Bac. typhi*. Dank den neuesten Forschungen, hauptsächlich aber dank den Arbeiten des Herrn Prof. Forster und seiner Schüler, wissen wir, daß die Gallengänge und besonders die Gallenblase den beliebtesten Ort der Entwicklung von *Typhus bacillen* im Körper des Kranken vorstellen, daß die *Typhus bacillen* unter günstigen Bedingungen (Alteration der Blase und der Galle selbst) hier

die Krankheit überstehen, bis zur vollständigen Genesung und sogar im Laufe mehrerer Jahre in der Blase leben und sich vermehren können. Mit der Galle zusammen gelangen sie in die Gedärme und von dort mit dem Inhalt letzterer an die Außenwelt. So entsteht die Erscheinung, welche als chronisches Tragen der Typhusinfektion durch gesunde Menschen bezeichnet wird.

Eingedenk dieser Beobachtungen über die Pathologie und Epidemiologie des Abdominaltyphus und eingedenk der Neigung überhaupt aller Infektionen des Intestinaltrakts, in der Leber zu nisten, wendete ich mich, zwecks der Erklärung des vorliegenden Falles, zu einer Untersuchung der Veränderungen in den Gallenwegen, in der Hoffnung, hier eine Erklärung der Erkrankung zu finden, und wie wir sahen, haben meine Erwartungen mich nicht getäuscht. Wie man sich später auch bei Untersuchung des reichlichen Materials, welches die bis jetzt in St. Petersburg wütende Epidemie bietet, überzeugen konnte, ähnelt der Cholera vibrio in obgenannter Beziehung dem *Bac. typhi* im größten Maße. Er nistet sich sehr oft in der Leber und in den Gallenwegen ein. Bei der Sektion ist es sehr leicht, ihn aus diesem Organ auszuscheiden, und zwar größtenteils als Reinkultur. Dabei bleibt die Galle in akut verlaufenden Fällen vollständig durchsichtig und dunkelbraungrün gefärbt. Die an ihr bemerkbaren Veränderungen beschränken sich auf eine starke Eindickung und Bereicherung an Schleim, was die Folge des Flüssigkeitsverlustes des Organismus und des katarrhalischen Zustandes der Gallenblase selbst ist. In einer ganzen Reihe anderer Fälle, wo die Krankheit länger andauerte (5—6 Tage), fanden sich in der Gallenblase zweifelloso Anzeichen von Cholecystitis vor. Die Galle selbst war vom Eiter und von den aus ihr ausgeschiedenen Gallenpigmenten getrübt.

In solchen Fällen ergab die bakteriologische Analyse immer das Vorhandensein von Cholera vibrionen in der alterierten Galle. Aus der Zahl von 109 Cholera sektionen, die von mir an den Leichen im St. Maria-Magdalenenkrankenhaus verstorbener Cholera kranker ausgeführt und von Frl. L. P. Brülöw bakteriologisch untersucht wurden, fanden sich Cholera vibrionen nur in der Galle 22mal, nur in den Gedärmen 31mal, in der Galle und in den Gedärmen gleichzeitig 27mal. In 22 Fällen gab die bakteriologische Analyse ein negatives Resultat, trotzdem die bakteriologische Cholera diagnose bei Lebzeiten positiv ausgefallen war.

Folglich konnte der Cholera vibrio in 49 (d. i. ungefähr 46 Proz.) Fällen aus der Galle und in 58 (oder 54 Proz.) aus dem Darne ausgeschieden werden.

Diese Tatsachen ergänzen den oben beschriebenen Fall in sehr vorteilhafter Weise und werfen ein grelles Licht auf die Beziehung der Leber und der Gallengänge zu der Cholera infektion. Wir sehen, daß die Gallengänge durchaus nicht zufällig als Entwicklungsherde der Cholera vibrionen dienten, sondern es in der Regel sind und sich in dieser Beziehung nur wenig vom Darm unterscheiden.

Diese Neigung des Cholera vibrio, sich in der Leber und in den Gallengängen einzunisten, ist durchaus nicht eine Eigentümlichkeit der diesjährigen Epidemie. Aehnliche Beobachtungen wurden auch schon anderwärts während früherer Epidemien gemacht. So untersuchten Nicati und Rietsch (1884) in 3 Fällen die Gallenblase und fanden dabei in 2 Fällen Cholera vibrionen. Ein anderes Mal untersuchten sie 5 Fälle, von denen 2 den Cholera vibrio unter anderem auch in der Galle

ergaben¹⁾. Ebensolche Beobachtungen wurden mitgeteilt von Doyen²⁾ (1884—1885), Tizzoni und Cantani³⁾ (1886), J. F. Rapschewsky⁴⁾ (1886), L. P. Rekovsky⁵⁾ (1892) und anderen.

Es stellen also die Gallengänge sehr gewöhnliche Ansiedelungsorte der Cholerainfektion im Organismus vor. Die Choleravibrien können ziemlich lange in der Gallenblase leben und bei Untersuchung der Leichen leicht ausgeschieden werden. Die Feststellung dieser Tatsache führt natürlicherweise zu einer weiteren Analogie zwischen der Cholera und dem Abdominaltyphus. Sie weckt das Verlangen, das Tragen der Cholerainfektion durch gesunde Menschen in kausalen Zusammenhang mit der Einnistung des Choleravibrio in den Gallengängen zu bringen, wie das jetzt für den Abdominaltyphus schon festgestellt ist. Selbstverständlich ist der vorliegende Stoff nicht genügend, um die Frage endgültig zu beantworten, aber Beobachtungen, wie die von mir mitgeteilten und wie die oben angeführten Ergebnisse der bakteriologischen Untersuchung der Galle von Cholerakranken, geben uns die Möglichkeit, anzunehmen, daß der Choleravibrio im Falle seines andauernden Vorhandenseins im Organismus gesunder Menschen sich in der Leber, insbesondere aber in der Gallenblase und den Gallengängen einnistet.

Zum Schlusse will ich kurz darauf hinweisen, daß der von mir beschriebene Fall noch in einer anderen Beziehung interessant ist. Er beweist, daß im Widerspruch zu den offiziellen Berichten das Eindringen der Cholerainfektion nach St. Petersburg nicht im Sommer des Jahres 1908, sondern schon im Herbst von 1907 stattfand. Auf welche Art die Einschleppung der Krankheit vor sich ging, blieb unbekannt, denn der erkrankte Dubow lebte seit 2 Jahren beständig in St. Petersburg und konnte sich folglich nur in der Stadt selbst angesteckt haben.

Da er Bettler war und keinen ständigen Aufenthalt hatte, so konnte nach seinem Tode, trotz aller Bemühungen, nicht festgestellt werden, wo er sich die Ansteckung geholt hatte.

Nachdruck verboten.

Ueber die Aetiologie des Scharlachs.

Biologische Untersuchungen zur Kenntnis desselben.

[Institut für allgemeine Klinik der Kgl. Universität Genua (Direktor Prof. E. Maragliano).]

Von Dr. Spiro Livierato, Privatdozent und Assistent.

Ich habe schon früher erwähnt, daß in biologischer Beziehung das Blutserum der Personen zu diagnostischen Zwecken angewendet wurde. Meine weiteren diesbezüglichen Untersuchungen haben die folgenden Resultate ergeben: Das Serum wurde mittelst Aderlasses aus einer der

- 1) Recherches sur le cholera. (Arch. de physiol. norm. et pathol. Paris 1885.)
- 2) Le Progrès méd. 1885. No. 27. — Compt. rend. de la soc. biol. 1884. No. 42. — Ref. Centralbl. f. med. Wissensch. 1886. No. 7.
- 3) Centralbl. f. med. Wissensch. 1886. No. 43.
- 4) Wratsch. 1886. No. 4, 5.
- 5) Arch. d. scienc. biol. St. Pétersbourg. T. I. 1892.

Adern der Ellenbogenbiegung von Personen erhalten, die sich nicht nur in unseren Kliniken, sondern auch im Spitale und dem Lazarette befanden. Der Aderlaß wurde immer während der geschwürsartigen Flechte der Krankheit vorgenommen, und zwar am Tage des Eintritts eines jeden Kranken, oder am darauffolgenden Tage, wenn er eine erhöhte Temperatur und einen typischen und markierten Ausschlag der Haut zeigte.

Ich erhielt dieses Serum in dem Blutserum, indem ich mich dabei auf das Anhalten der Hämolyse stützte, oder auch jedesmal, wenn ich Untersuchungen anstellte, ob Stoffe oder Körperchen der folgenden Mikroorganismen vorhanden waren:

Streptococcus pyogenes, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus albus*, *Diplococcus Fränkel*, *B. typhi*, *B. influenzae*, *B. coli* und *tetragonus*.

Die beträchtliche Anzahl der Mikroorganismen, mit welchen die einzelnen Serumarten versucht wurden, möge dadurch gerechtfertigt werden, daß ich den Wunsch hegte, die Resultate möglichst ausgiebig zu prüfen und zu kontrollieren.

Von jedem dieser Mikroorganismen wurde die sterile Wasseremulsion aus junger Kultur auf Agar hergestellt (Durchgang 24 Stunden).

Vom *Streptococcus* habe ich zwei Typen verwendet, von welchen der eine aus einer schweren diphtherischen Assoziation isoliert war, die den Tod zur Folge hatte und sehr virulent war für die gewöhnlichen Laboratoriumstiere; die andere war aus einem typischen Fall von Gesichtsröse isoliert.

Bezüglich der von mir angewandten Methode sei bemerkt, daß ich mich streng an die klassische Methode von Bordet und Gengou gehalten habe.

Die Alexine, die Kulturemulsion und das Serum des einzelnen Kranken wurden nacheinander in die Röhren eingeführt. Nachdem die verschiedenen Röhren geschüttelt waren, wurden sie bei 37° in Ruhe gelassen und nach 3 Stunden in eine jede von ihnen die hämolytische Mischung eingeführt.

Die Reaktion, welche sich schon nach einer 1/2 Stunde ableitete, war nach 3—5 Stunden sehr augenscheinlich.

Ich muß noch bemerken, daß zuerst von allen Untersuchungsarten die Kontrollversuche in Beziehung auf die hämolytische Potenz gemacht wurden. Das geschah sowohl hinsichtlich der verschiedenen Serumarten, als auch hinsichtlich der verschiedenen Bakterienemulsionen. Ferner muß ich anführen, daß bei den Resultaten nur der vollständigen Hemmung der Hämolyse Rechnung getragen werde, also vollständige Abwesenheit, und nicht einer einfachen Verminderung der hämolytischen Potenz.

Der von mir bei meinem zweijährigen Studium untersuchten Scharlachfälle sind 18.

Die erhaltenen Resultate können kurz so ausgedrückt werden: Vollständige, immer konstante Hemmung der Hämolyse nur in jenen Röhren, in welchen in der biologischen Reaktion zusammen mit dem Serum eines Scharlachkranken als Antigenemulsion von *Streptococcus*-Kultur angewendet wurde; ebenso konstante Hämolyse in allen anderen Röhren, in welchen zusammen mit dem Serum eines Scharlachkranken als Antigen eine Emulsion von anderen verschiedenen Mikroorganismen funktionierte, nämlich *Staphylococcus aureus*,

Staphylococcus albus, *Diplococcus*, *B. typhi*, *B. coli*, *B. influenzae* etc.

Die Resultate basierten auf den Begriffen der biologischen Reaktion, nämlich:

Demonstration im Blutserum von Scharlachkranken, die mit Stoffen — im weitesten Sinne des Ausdrucks — geprüft sind, die konstant spezifisch gegen den *Streptococcus* sind.

Ich glaube, daß die Wichtigkeit und die nützliche Anwendung dieser Funde durch das Faktum gegeben ist, daß sie — wegen der Anzahl der studierten Fälle, wegen der Klarheit und der Beständigkeit der Resultate — einen klaren und nicht zu unterschätzenden Beitrag bilden, um die Streptokokkennatur des Scharlachs zu bekräftigen, welche von verschiedenen, schon von mir erwähnten Forschern aufrecht erhalten wird, und zwar besonders von Babes, v. Kurth, Merignac, Masny, Fischer und Soerensen, welche die Aetiologie des Scharlachs studierten, wobei sie sich der gewöhnlichen direkten bakteriologischen Prüfung bedienten.

Nachdruck verboten.

Kala-Azar in Sizilien und Kalabrien¹⁾.

[Aus der Medizinischen Klinik der Königl. Universität zu Messina.]

Zweite Mitteilung.

Von

Prof. Dr. **Umberto Gabbi**, und Dr. **Rosario Caracciolo**,
Vorsteher. Oberassistentarzt.

Mit 1 Tafel.

I. Klinische Beobachtungen (Prof. U. Gabbi).

Schon seit einigen Jahren beobachtete ich eine wirklich außergewöhnliche Zahl von Fällen der fieberhaften Varietät der *Anaemia splenica infantilis pseudoleucaemica* im Vergleich mit der geringen Zahl von Fällen von der fieberlosen Varietät dieser Krankheit. Diese Häufigkeit fiel mir besonders auf und veranlaßte mich zu einer besonderen Untersuchung dieser Erscheinung, wobei ich eine bisher nicht wahrgenommene Tatsache feststellte, nämlich das Vorhandensein von endemischen Herden der Krankheit in einigen Dörfern der sizilianischen und kalabresischen Küste und der äolischen Inseln. Diese meine Beobachtung habe ich in einer jüngst erschienenen Veröffentlichung²⁾ berichtet.

Ich konnte des weiteren, indem ich meine Untersuchungen fortsetzte, zwei weitere Tatsachen von einer gewissen Bedeutung feststellen:

1) Daß bei den älteren Kranken weder Syphilis noch Rachitis anamnestisch nachzuweisen war, was vollständig im Gegensatz steht zu dem, was man bei der apyretischen Varietät der Krankheit beobachtet, wo die zwei genannten Krankheiten fast immer in der Anamnese der Eltern zu finden sind.

1) Ins Deutsche übertragen von Dr. K. Rühl, Turin.

2) Gabbi, U., Focoli endemici della varietà febbrile della cosiddetta anemia splenica infantile pseudoleucemica. (Il Policlinico. 1909. Januar.)

2) Daß in einer bestimmten Familie, wo man mehrere Fälle der febrilen Form beobachtet, nicht immer die schwächsten Individuen diejenigen sind, welche von der Krankheit heimgesucht werden.

Diese vor 4 Jahren beobachteten Tatsachen legten mir den Gedanken nahe, daß die febrile Varietät der infantilen splenischen Anämie keine ätiologische Beziehung zur afebrilen Varietät habe, von welcher nie endemische Herde beschrieben worden sind.

Ich beobachtete außerdem bei einer eingehenderen und sorgfältigen Untersuchung der Symptomatologie der beiden Krankheitsformen, daß nicht nur zwischen ihnen der wichtige Unterschied des Vorhandenseins oder Fehlens des Fiebers besteht, sondern daß auch einige andere Symptome der febrilen Form von denjenigen der apyretischen Varietät abweichen.

Darüber habe ich schon in dem oben erwähnten Aufsatz berichtet; hier sei nur hinzugefügt, daß die Abart mit äußerst langsamem Verlauf nur bei der apyretischen Varietät beobachtet wird.

Während ich mir nun vorbehalte, später durch klinische Dokumente meine Behauptung auf das ausgiebigste zu begründen, will ich in gegenwärtiger Schrift nur betonen, daß ich nicht nur, von ätiologischen und klinischen Ergebnissen ausgehend, angenommen habe, daß die febrile Varietät der *Anaemia splenica infantilis pseudoleucaemica* eine echte Infektionskrankheit ist, wie unter anderen besonders Fede behauptet hatte, sondern auf Grund geeigneter Untersuchungen die Annahme in Abrede gestellt habe, daß es sich um sporadische Malariaformen in Gegenden handle, welche die Tradition und die tellurische Konstitution des Erdbodens als immun bezeichneten.

Bei zahlreichen Blutuntersuchungen konnte nie ein Malariaparasit nachgewiesen werden, ebenso wie nie irgendeine Andeutung auf die besonderen Blutveränderungen beobachtet wurde, welche derselbe hervorruft. Dazu kommt noch die vollständige Unwirksamkeit des Chinins in allen seinen Darreichungsformen resp. Einführungsarten.

Ein Vergleich zwischen den klinischen Charakteren der febrilen Form und denjenigen anderer Krankheiten, deren Symptomenbild demjenigen der Malaria ähnelt, führte mich zu der Vermutung, daß es sich um Kala-Azar handelte, von dem ich einen klinischen Fall 1905 in London gesehen hatte und dessen Symptome vollständig denjenigen entsprachen, welche meine kleinen Patienten aufwiesen.

Als ich im Juni 1907 bei einer Vorlesung in meinem Fortbildungskursus für Aerzte einen Fall von schwerer primärer Anämie (perniziöse progressive Anämie) vorstellte, wies ich, als ich die Differentialdiagnose erörterte, auf die schweren primären splenischen Anämieen hin, und äußerte meinen Verdacht, daß Kala-Azar auch in Sizilien vorhanden sei. So nahm ich (nicht ohne bedeutende Schwierigkeiten!) einige solcher kranken Kinder in meine Klinik auf und beauftragte meinen Assistenten, Herrn Dr. Caracciolo, bei zweien der Kinder die Milzpunktion auszuführen, um Milzsaft zu gewinnen und denselben bakteriologisch zu untersuchen, und nach den Mikroorganismen von Leishman-Donovan zu fahnden. Ueber die Resultate der mit Frischbereitung und mit geeigneten Färbungsmethoden gemachten Beobachtungen wird Dr. Caracciolo selbst weiter unten berichten.

Inzwischen möchte ich die Wichtigkeit des Nachweises dieser Tropenkrankheit in Süditalien hervorheben und im Interesse der Malariaforschung auf die Möglichkeit hinweisen, daß sich unter den Fällen von

kindlicher Malaria in unserem Lande solche von Kala-Azar verbergen. Die klinische Frage habe ich noch nicht vertieft. Dieselbe erfordert unter anderem Untersuchungen über die Beziehungen des Kala-Azar nicht nur mit der afebrilen pseudoleukämischen Anaemia splenica infantilis, sondern auch mit der Malaria der Erwachsenen, da kein Grund vorliegt, um auszuschließen, daß die genannte Tropenkrankheit, ebenso wie in Nordafrika und in Südasien, auch bei uns, so wie die Kinder, auch die Erwachsenen befallen kann.

II. Mikroskopische Untersuchungen (Dr. Rosario Caracciolo)¹⁾.

Die Milzpunktion wurde bei 2 Kindern (gewisser De Salvo, aus einem Dorfe der Umgebung von Messina, und gewisser L. F., aus einem kalabresischen Dorfe) ausgeführt, welche die febrile Varietät der Anaemia splenica infantum aufwiesen.

Das gewonnene Milzblut wurde zum Teil in frischem Zustande untersucht, zum Teil auf Deckgläschen ausgebreitet, mit einer Mischung von Aether und Alkohol fixiert und nach den Methoden von Romanowsky-Leishman, Marino und Laveran gefärbt. Die besten Präparate erhielt ich mit der letzteren Methode.

Bei der Untersuchung der Frischpräparate des Milzblutes des ersten Patienten (De Salvo) beobachtete man neben nicht recht definierbaren rundlichen oder eiförmigen Körperchen andere auch rundliche, aber mit langen Geißeln versehene Körperchen, so daß die roten Blutzellen der Umgebung wiederholt und heftig geschlagen und nach verschiedenen Richtungen gestoßen wurden.

Bei der Untersuchung des fixierten und gefärbten Blutes beobachtete man bei beiden Patienten in äußerst großer Zahl parasitäre Gebilde (Fig. 1), welche eine eiertige oder rundliche Form und eine Länge von 3—4 μ aufwiesen, und deren Protoplasma eine blasse blaue Farbe mit deutlichen Umrissen annahm und in einigen der Körperchen Rarefaktionszonen, in anderen deutliche Vakuolen zeigte. Im Inneren beobachtet man stets zwei sich stark blau färbende Körperchen, das eine, größere, ist rundlich oder eiförmig, das andere, kleinere, ist stäbchenförmig oder auch rundlich (Blepharoblast); wenn letzteres die längliche Form aufweist, ist seine Längsachse der größeren chromatischen Masse bald parallel, bald perpendikular angeordnet.

Diese parasitären Gebilde sind in den Präparaten sehr zahlreich, sodaß man fast in jedem mikroskopischen Felde ein oder mehrere davon findet; dieselben sind meistens isoliert, man findet jedoch an einigen Stellen zahlreiche angesammelt (Fig. 2); stellenweise findet man auch solche, die in einer homogenen, schwach färbbaren Substanz eingebettet sind, vollständig der von Nicolle beschriebenen sogenannten Ganga entsprechend.

Neben den eben beschriebenen Parasiten findet man in beiden Fällen, obwohl in sehr geringer Zahl, andere längliche Gebilde (Fig. 3), gleichfalls mit schwach blau gefärbtem Protoplasma und einer einzigen, kleinen, rundlichen oder eiförmigen chromatischen Masse, welche gewöhnlich in der Nähe einer der beiden Enden gelegen ist. Diese Gebilde sind fast immer zu Gruppen vereinigt und nebeneinander angeordnet, wie man in der Figur sehen kann.

1) Die Präparate wurden bei einer Sitzung der R. Accademia Peloritana in Messina vorgelegt.

1



2



3.



Was nun die Deutung der ersten, zahlreichsten Gebilde anbelangt, so kann man nicht bezweifeln, daß sie, ihren Dimensionen, ihrer Struktur und ihren färberischen Charakteren nach, der *Leishmania Donovanii* entsprechen. Die länglichen, uninukleierten, meistens gruppenweise vereinigten Formen stellen nach meiner Ansicht höchstwahrscheinlich denselben Parasiten in einer Reproduktionsphase dar.

Die in den Frischpräparaten beobachteten und ohne Zweifel mit Geißeln versehenen Gebilde können nach meiner Meinung mit denjenigen identifiziert werden, welche man in den Kulturen von Kala-Azar-Parasiten im Nährboden von Novy-Néal immer findet.

Nachdruck verboten

Untersuchungen zur Aetiologie und Biologie der Tumoren.

IX. Mitteilung¹⁾.

Von Dr. E. Saul, Berlin.

Mit 15 Figuren.

In Verfolgung der früher mitgeteilten Experimente wünschte ich die Morphologie und Biologie parasitischer Protozoen zu untersuchen, die als exquisite Epithelschmarotzer bekannt sind. Unter ihnen wählte ich das *Coccidium oviforme*²⁾ des Kaninchens. — Die Kultivierung desselben wurde derart durchgeführt, daß ich coccidienhaltige, umfängliche Leberstücke unter aseptischen Kautelen in Erlenmeyersche Kolben legte, die, mit sterilem Wasser gefüllt, bei Zimmertemperatur gehalten wurden. Die in den ersten Tagen auftretenden, stinkenden Zersetzungsprodukte können dadurch entfernt werden, daß man während 1—2 Wochen das Wasser in den Erlenmeyerschen Kolben täglich erneuert. — Die zu schildernden Präparate entstammen einjährigen Kulturen; sie sind teils durch Abimpfung mit der Oese, teil durch Schnittserien gewonnen.

Fig. 1. Ungefärbtes Schnittpräparat. Osmiumfixierung. Vergrößerung 1:250. — Man erkennt zwischen den Zerfallsprodukten des Lebergewebes junge Coccidien, teils ohne Umhüllung (Gymnosporen), teils encystiert (Cystosporen). In diesem Alter verhalten sich die Coccidien gegenüber den mikrochemischen Reagentien wie homogene Fettkörper; sie können daher in den epithelialen Wirtszellen als Fetttropfen (Osmiumfixierung), bzw. als Vakuolen (Alkoholfixierung) erscheinen.

Fig. 2. Ungefärbtes Schnittpräparat. Osmiumfixierung. Vergrößerung 1:250. — Die Coccidien erscheinen gekörnt, weil ihr ursprünglich homogener Körper bei fortschreitendem Alter eine Differenzierung von osmophiler und nicht osmophiler Substanz erlitten hat. Nach der Sudanfärbung erscheinen beide Substanzen rot, alkoholbeständig ist nur die nicht osmophile Substanz. Deshalb kann die letztere zu den Lipoiden, die erstere zu den Fettkörpern gerechnet werden.

1) Vgl. Centralbl. f. Bakteriolog. Abt. I. Orig. Bd. XLIX. 1909. p. 80 usw.

2) In der vorliegenden Publikation ist die Morphologie und Mikrochemie des *Coccidium oviforme* nur insofern berücksichtigt, als sie für die Tumorforschung Interesse besitzt. Im übrigen verweise ich auf die vortrefflichen Untersuchungen von Metzner, Arch. f. Protistenk. Bd. II. 1903; Pfeiffer, R., Die Coccidienkrankheit der Kaninchen. Berlin 1892; Schaudinn, Arbeiten aus dem Kaiserl. Gesundheitsamt. Bd. XIX. 1903.

Fig. 3. Gefärbtes Schnittpräparat. Alkoholfixierung. Giemsa-Färbung. Vergrößerung 1:1000. — Diejenigen Stellen, an denen die Coccidien

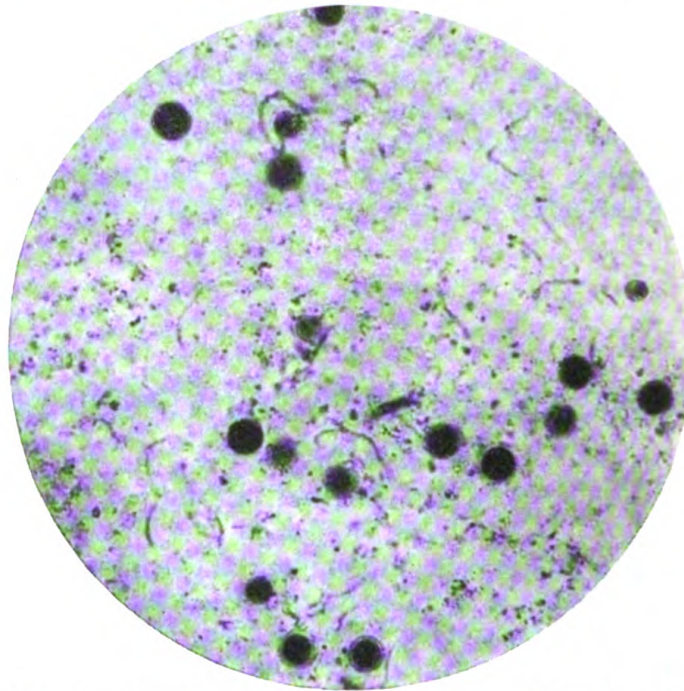


Fig. 1. Gymnosporen und Cystosporen. Vergr. 1:250.

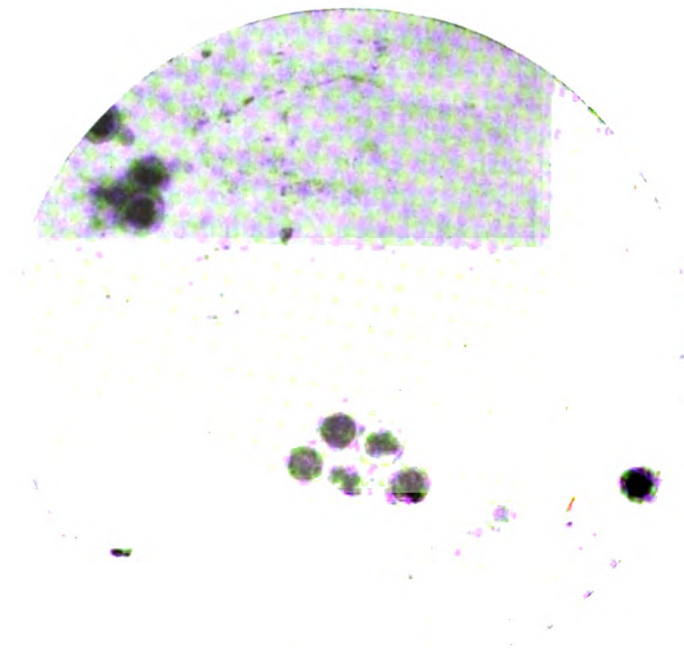


Fig. 2. Cystosporen. Vergr. 1:250.

durchlöchert erscheinen, entsprechen der Fettsubstanz, die angrenzenden, alkoholbeständigen Teile entsprechen der Lipoidschubstanz. Nach der Giemsa-Färbung erscheint die letztere rot, die doppelt konturierte

Hülle blau. An der Peripherie erkennt man die Schleimschicht. Mit **Leuckart** übereinstimmend, möchte ich bekunden, daß die letztere niemals bei reifen Coccidien wahrgenommen wird; die Coccidien unterliegen also mit steigendem Alter einer Art von Häutung.

Fig. 4. Reife Coccidien in verschiedenen Phasen der Entwicklung. Dieses Präparat ist ebenso wie die folgenden (Fig. 5—8) durch Abimpfung mit der Oese gewonnen, weder fixiert noch gefärbt. Vergrößerung 1:1000. — Der Sporont des einen Coccidiums (a) verläßt einen Pol der ovalen Cystenwand, um Kugelform zu gewinnen, ein Vorgang, welcher als Merkmal der eben erfolgten Befruchtung gilt. — Der Sporont des zweiten Coccidiums (b) zeigt vollendete Kugelform. Das Stigma an dem einen Pol der Cyste deute ich als optischen Ausdruck der Mikropyle. — Das

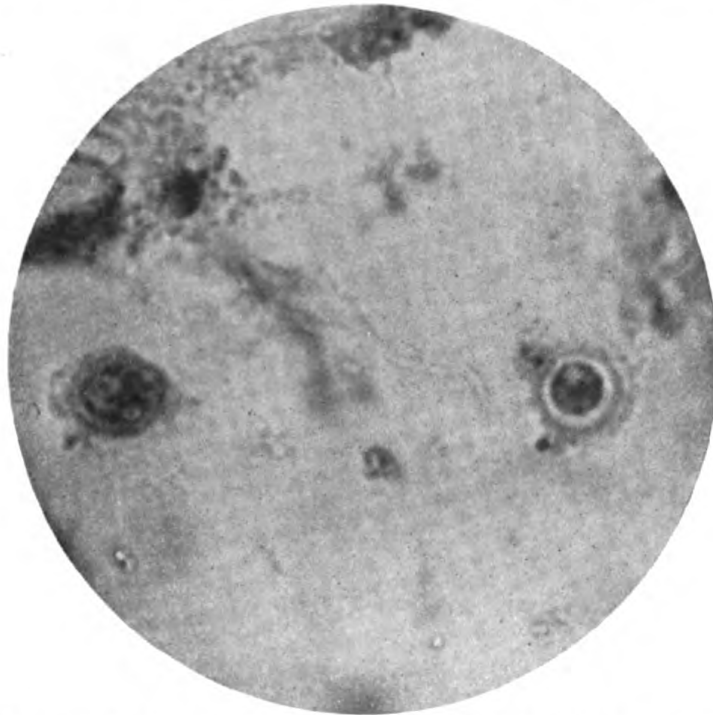


Fig. 3. Encystierte Coccidien; an der Peripherie jeder Cyste erkennt man die Schleimschicht. Vergr. 1:1000.

dritte Coccidium (c) zeigt neben der geballten Plasmamasse spermatozoide Mikrogameten; diese Cyste ist deshalb als männliches Coccidium, Mikrogametocyt, zu bezeichnen. — Der Sporont des vierten Coccidiums (d) tritt in die Phase der Pyramidenbildung, wie sie zuerst R. Pfeiffer beschrieben hat (l. c. p. 8). — Das Plasma des fünften Coccidiums (e) erfüllt mit seiner ovalen Form fast den ganzen Raum der Cyste. Dieses Coccidium läßt in keiner Weise die geschlechtliche Differenzierung erkennen.

Fig. 5. Reifes Coccidium männlichen Geschlechts, Mikrogametocyt. Vergrößerung 1:1000. — Neben der grob gekörnten Plasmamasse erscheint eine Anzahl spermatozoider Mikrogameten, an denen man den spindelförmigen Kopf und das mit zwei Geißeln ausgestattete Schwanzende unterscheidet.

Fig. 6. Reifes Coccidium. Vergrößerung 1:1500. — Das Plasma des Coccidiums hat sich kugelförmig geballt und ein Chromidial-

partikel ausgestoßen. Die biologische Bedeutung dieses Vorganges ist von Fall zu Fall verschieden, sie kann auf vegetativem oder sexuellem Gebiete liegen. Im Zentrum der Plasmakugel erscheint der Coccidienkern.

Fig. 7. Reifes Coccidium. Vergrößerung 1:1000. — Der Kernfleck des einen Coccidiums (a) ist an die Peripherie des Sporonten gewandert. Nach Untersuchungen Schaudinns kennzeichnet dieser Vorgang den Beginn der Kernteilung, durch welchen die Sporogonie eingeleitet wird. Das zweite Coccidium (b) zeigt zwei Sporoblasten, zwischen ihnen den Rest des Sporonten: „den Restkörper“. In den

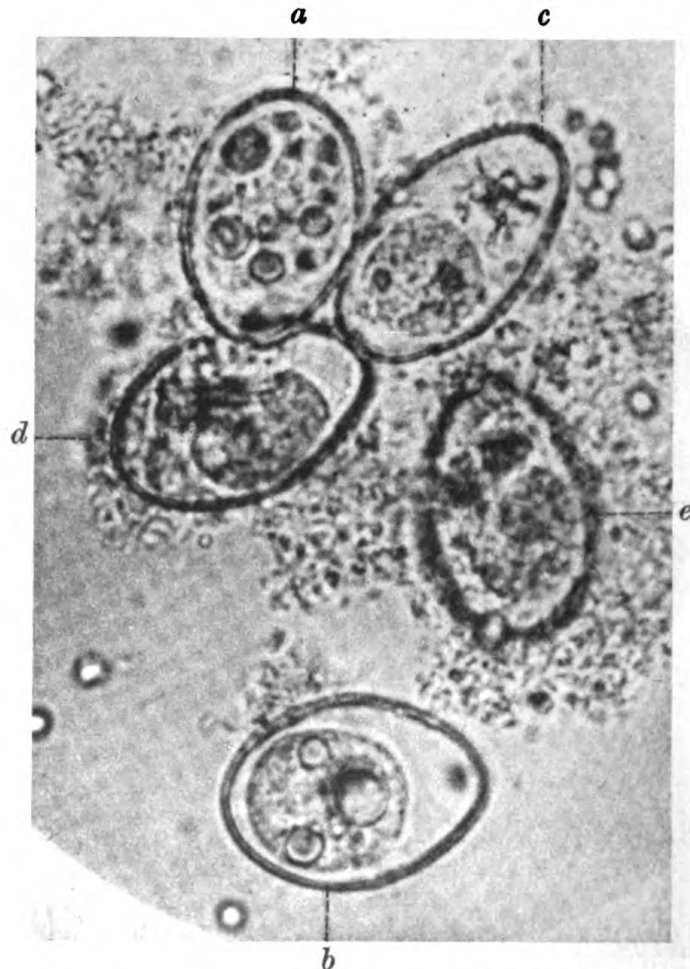


Fig. 4. Coccidium a, b, d. Makrogametocyten (weibliche Coccidien). Coccidium c. Mikrogametocyt (männliches Coccidium). Vergr. 1:1000.

Sporoblasten ruhen die Sporozoiten, an denen man einen sichelförmigen, vorn verjüngten Teil, das Kopfende, und einen eiförmig verdickten Teil, das Schwanzende, unterscheidet. Das Kopfende erscheint fein granuliert, das Schwanzende fast homogen.

Fig. 8. Coccidium muris. Vergrößerung 1:1500. — Im Organismus der Maus stellt dieser Parasit ein kugeliges Gebilde dar, das einen Kern und granuliertes Entoplasma enthält. Während der Kultivierung scheidet das Coccidium eine zweischichtige Kapsel aus, und an die Stelle des Kernes treten drei Sporoblasten, von denen jeder mit einer besonderen Hülle umgeben ist. Im Verlaufe der Züchtung hat der Kern jedes Sporoblasten sich zweimal geteilt. Aus diesen Teilungs-

produkten gehen im Organismus des infizierten Tieres die amöboiden Formen der jungen Coccidien, die Sporozoiten, hervor.



Fig. 5. Mikrogametocyt (männliches Coccidium). Vergr. 1:1000.

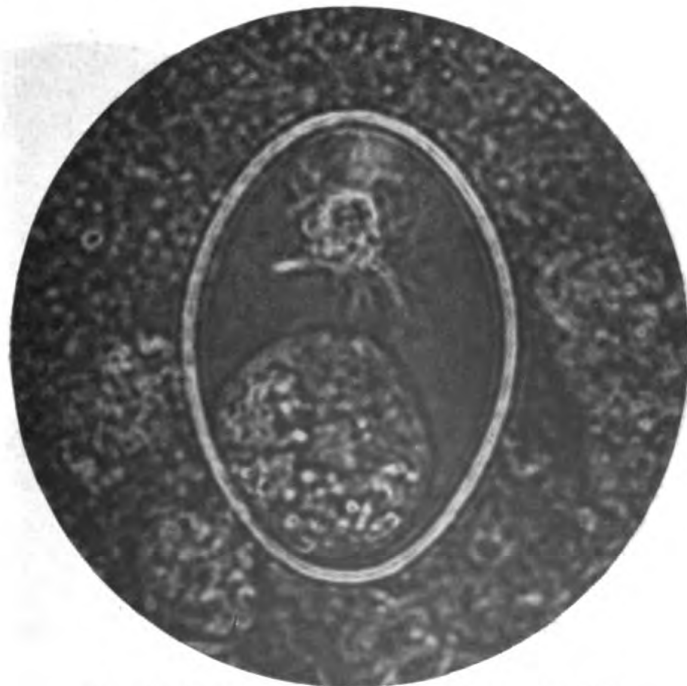


Fig. 6. Mikrogametocyt (?). Vergr. 1:1500.

Fig. 9. Ungefärbtes Schnittpräparat von einem kultivierten Coccidienknoten der Kaninchenleber. Osmiumfixierung. Vergrößerung 1:500. — Unter den vier Coccidien des Gesichtsfeldes hat nur eines die Fixierung

ertragen. In diesem erscheinen zwei osmophile Binnenkörper, von denen der größere den Sporonten darstellt, während der kleinere als ausgestoßene Chromidialmasse oder als Spore gedeutet werden kann. Mit

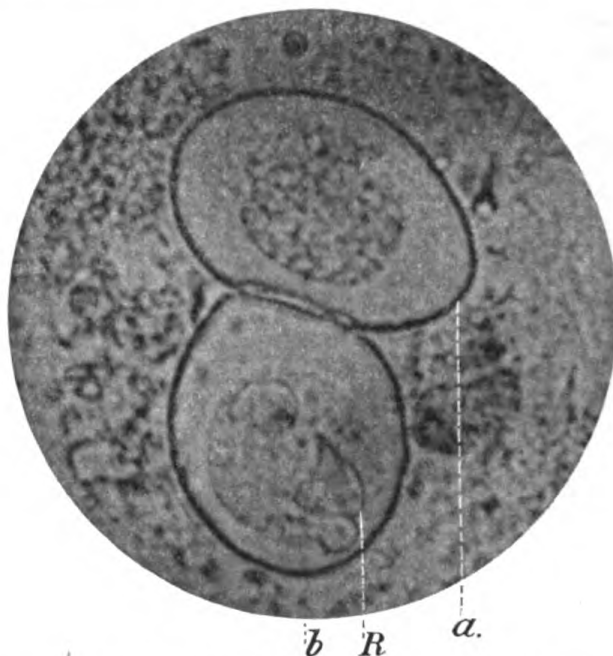


Fig. 7. *Coccidium a.* Der Kernfleck ist an die Peripherie des Sporonten gewandert. *Coccidium b.* Zwischen den Sporozoiten liegt der Restkörper (*R*). Vergr. 1:1000.

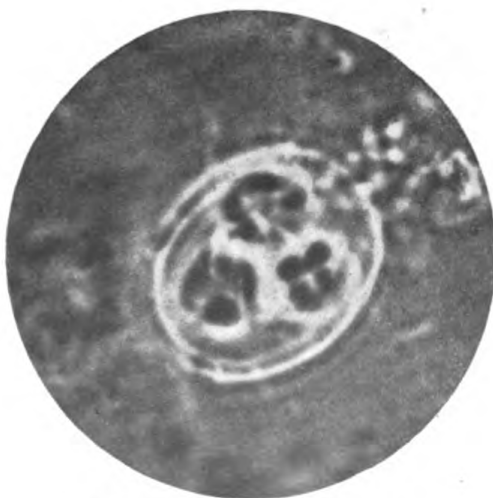


Fig. 8. *Coccidium muris*.



Fig. 9. Sporulation des *Coccidium oviforme*. Vergr. 1:500.

steigendem Alter verliert die Cystenwand der Coccidien derart an Kohärenz, daß sie die Fixierung nicht erträgt. Die drei Coccidienreste an der Peripherie des Gesichtsfeldes sind Beispiele dieser Senilität.

In der ersten Jugend wie im höchsten Alter gibt der Körper der Coccidien die Fettreaktionen, so daß in diesen Phasen ihr Leben an Fettsubstanzen zu haften scheint. In den Altersstadien, welche zwischen den genannten Extremen liegen, enthält das Plasma der Coccidien Substanzen, die sich gegenüber der Fixierung und Färbung wie Lipotide (rot nach Sudan- und Giemsa-Färbung und alkoholbeständig) bzw. Eiweißkörper (blau nach Giemsa-Färbung und alkoholbeständig) verhalten.

Diese Erfahrungen möchte ich zugunsten der von Voit und seinen Schülern behaupteten, genetischen Beziehungen zwischen Fett- und Eiweißkörpern verwerten, da auch Pflüger¹⁾ die Möglichkeit eines derartigen Verhältnisses aus deszendenztheoretischen Gründen nicht bestritten hat. Im übrigen ist zu erwägen, inwiefern die Coccidien ihren Fettkörpern die Fähigkeit verdanken, in den Gallenwegen und der Darm-schleimhaut junger Kaninchen epitheliale Wucherungen hervorzurufen, welche unter den Erscheinungen des fortschreitenden Marasmus zum Tode führen.

v. Hansemann²⁾ hat bezüglich der atypischen Epithelwucherungen, die Bernhard Fischer erzeugte, als erwiesen erachtet, daß bestimmte chemische Stoffe, wie das mit „Scharlach R“ gesättigte Olivenöl³⁾ auf bestimmte Zellarten eine spezifisch chemotaktische Wirkung ausüben können, und daß solche Substanzen, dauernd produziert, für die Geschwulstentstehung ausschlaggebend sind und die Malignität auslösen können. Diese dauernde Produktion von Fettsubstanzen wird von dem *Coccidium oviforme* tatsächlich geleistet, wie oben dargelegt wurde. — An infiltrativem Wachstum werden die epithelialen Wucherungen, welche die Coccidien hervorrufen, gehindert durch die reaktive Bindegewebswucherung der angrenzenden Submucosa. Auch treten weder in der Blut- noch in der Lymphbahn der erkrankten Tiere metastatische Prozesse auf, weil die Coccidien in der Zirkulation der Kaninchen zugrunde gehen, selbst wenn sie denselben in kolossalen Mengen injiziert werden (vgl. R. Pfeiffer, l. c. p. 16). Aus diesen Gründen beruht die Malignität der Coccidiose auf den Allgemeinerscheinungen fortschreitender Kachexie, die schließlich den Tod herbeiführt.

Während die Coccidien extracellulär in cystischen Formen auftreten, welche die Fixierung häufig nicht ertragen, können sie in den infizierten Epithelien als Granula oder als Vakuolen erscheinen, wie zuerst R. Pfeiffer (l. c. p. 18) und Podwysotski (Centralbl. f. Bakteriologie. Bd. VI. 1889) nachgewiesen haben.

Beiträge zur Morphologie und Biologie der Cysticerken.

Durch die Arbeiten Borrels, auf welche ich wiederholt verweisen durfte (vgl. Centralbl. f. Bakteriologie. Bd. XLIX. 1909 usw.), haben die Helminthen neues Interesse für die Tumorforschung erlangt, sei es als Geschwulsterreger, wie der Bilharzia-Wurm und der *Cysticercus fasciolaris*, sei es als Träger parasitischer Protozoen, wie der Regenwurm, der Mehlwurm und die *Taenia expansa*. — In den früher mitgeteilten Versuchen konnte ich durch die subkutane Implantation des Schwanzteiles vom *Cysticercus fasciolaris* einen Tumor hervorrufen; für

1) Pflügers Archiv. Bd. LI. 1892. p. 229.

2) Naturforscherversammlung. Stuttgart 1906.

3) Die Erreger der „infektiösen Granulationsgeschwülste“, der *Aktinomyces-Pilz*, der Tuberkel-, Rotz- und Leprabacillus, sowie der Erreger des Kohlkrebsses, die *Plasmodiophora brassicae*, führen Fett in ihrer Leibeshülle.

die Genese desselben kamen die giftigen „Lipoidsubstanzen“ des *Cysticercus* und seine „Kalkkörper“ in Frage. Ich wünschte daher zu ermitteln, wie diese Körper im Leibe der Cysticerken angeordnet sind. Für diesen Zweck wählte ich den *Cysticercus pisiformis*. Gleichzeitig benutzte ich die Gelegenheit, die Beziehungen der Cysticerken zum Gefäßapparat zu erläutern; weil hierfür die genannten Cysticerken geeigneter sind, als der *Cysticercus cellulosae*, wie die Untersuchung L. Jacobsohns¹⁾ lehrt.

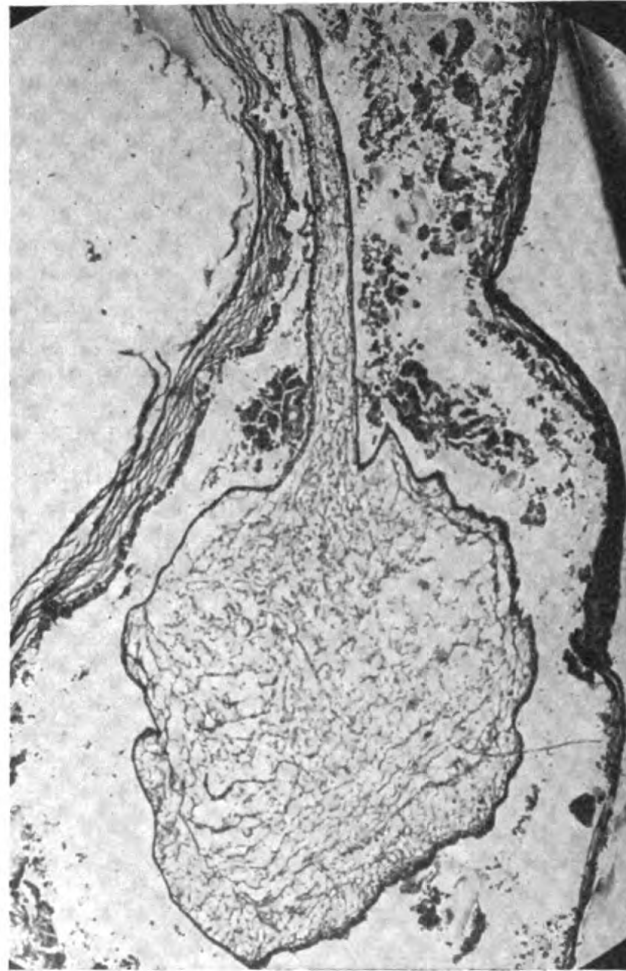


Fig. 10. *Cysticercus pisiformis*; Kapsel und Cysticercus im Uebersichtsbild; Längsschnitt. Vergr. 1:30.

Fig. 10. Uebersichtsbild des *Cysticercus pisiformis*. Osmiumfixierung. Längsschnitt. Giemsa-Färbung. Vergrößerung 1:30. — Man unterscheidet: Kopf, Hals und Schwanzblase. Die Kapsel des *Cysticercus* wird von den Wandungen eines verödeten Blutgefäßes gebildet, an dem Intima, Media und Adventitia erkannt werden.

Fig. 11. Kopf und angrenzender Teil des Halses in stärkerer Vergrößerung (1:300). Osmiumfixierung. Giemsa-Färbung. — In der Schnitt-

¹⁾ Jacobsohn, L., Ueber *Cysticercus cellulosae* usw. (Monatsschr. f. Psychiatrie u. Neurol. Bd. XXI. 1907. p. 119.)

ebene erscheint einer der vier Saugnapfe. Die Pars corticalis des Kopfes und Halses entbehrt „der Kalkkörper“, während hier die „Lipoidsubstanzen“ stark gehäuft auftreten. Dieselben sind osmophil und alkali-beständig, nicht alkoholbeständig und nach der Sudanfärbung rot.

Fig. 12. Grund der Schwanzblase in starker Vergrößerung (1:300). Osmiumfixierung. Giemsa-Färbung. — Man bemerkt, daß an diesem Teile „die Lipoidsubstanzen“ nur spärlich vertreten sind, während „die Kalkkörper“ (oval) überwiegen.



Fig. 11. Kopf und Hals des *Cysticercus pisiformis*. S Saugnapf. Vergr. 1:300.

Fig. 13. Kapsel des *Cysticercus fasciolaris* im Querschnitt. Alkoholfixierung. Gieson-Färbung. Vergrößerung 1:30. — Im Uebersichtsbilde wird der drei- und zweischichtige Teil der Kapsel unterschieden. Die Intima verläuft in wellenförmigen Linien, darauf folgt die Media und Adventitia; an die letztere grenzen die Leberzellen. Ich hebe hervor, daß es mir nicht gelungen ist, in den Wandungen der Kapsel Muscularis und Elastica nachzuweisen. Indessen fand ich in der Mediaschicht stiftförmige Kerne.

Fig. 14 und 15. Der zwei- bzw. dreischichtige Teil der Kapsel des *Cysticercus fasciolaris* in stärkerer Vergrößerung (1:100). Alkoholfixierung. Gieson-Färbung. — Man erkennt (Fig. 14) die allmäh-

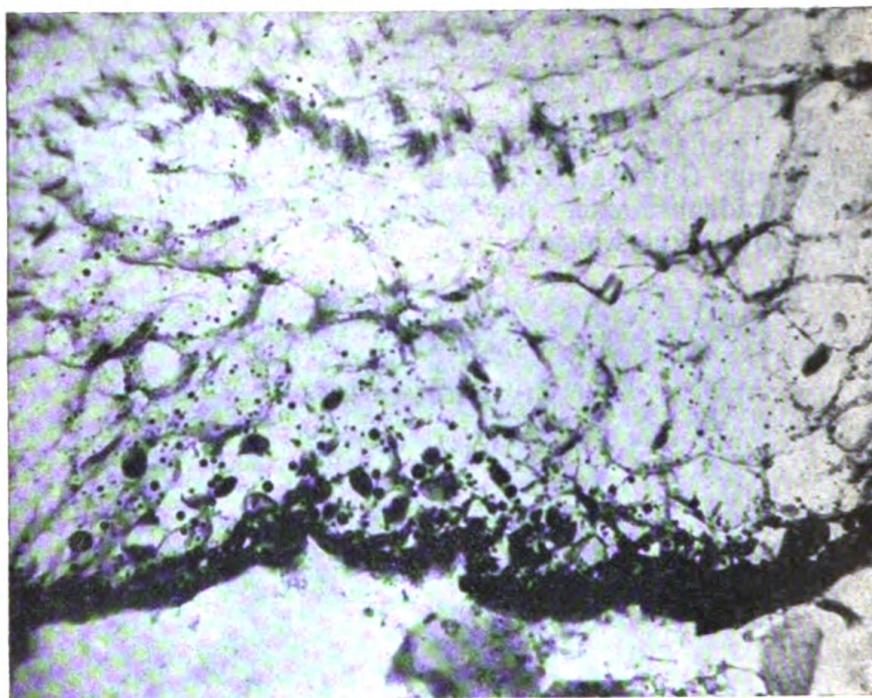


Fig. 12. Grund der Schwanzblase vom *Cysticercus pisiformis*. Vergr. 1:300.



Fig. 13. Kapsel des *Cysticercus fasciolaris*. Querschnitt. Uebersichtsbild.
Vergr. 1:30.

liche Verjüngung der Intima, welche schließlich schwindet, während Media und Adventitia restieren. Die letztere erscheint nach der Gieson-Färbung leuchtend rot, die erstere violett. Der zweischichtige Teil der

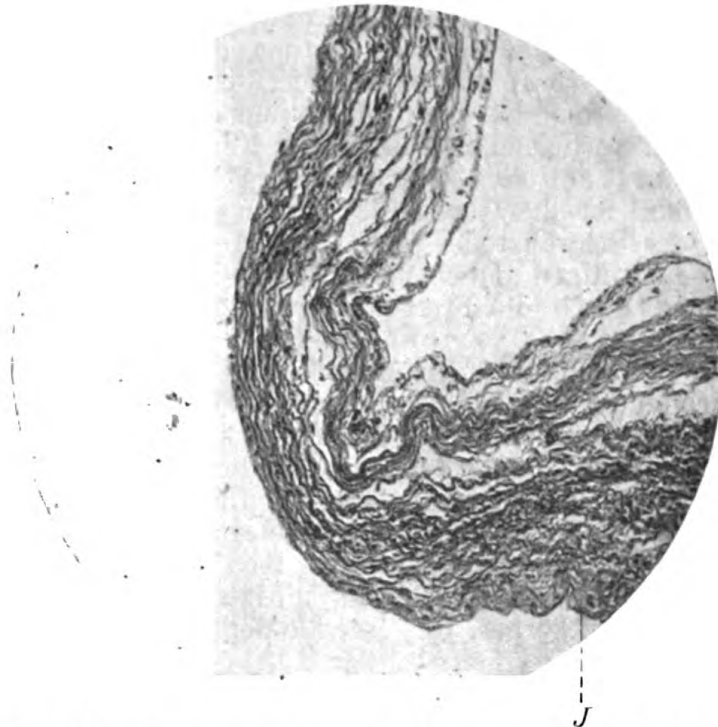


Fig. 14. Kapsel des *Cysticercus fasciolaris*, teils zweischichtig, teils dreischichtig. *J* Intima. Vergr. 1:100.



Fig. 15. Kapsel des *Cysticercus fasciolaris*; dreischichtiger Teil. *J* Intima. Vergr. 1:100

Kapsel dürfte derjenigen Stelle entsprechen, an welcher die Intima durch den *Cysticercus* gesprengt wurde. Der dreischichtige Teil der Kapsel (Fig. 15) zeigt die erhebliche Wucherung der Intima, welche ebenso, wie

die Media und Adventitia, kleinzellig infiltriert ist. Neben den Rundzellen erscheinen besonders in der Intima große Fibroblasten. Diese Befunde erinnern an proliferierende, arteriitische Prozesse, wie sie bei nicht infizierter Thrombose oder nicht infizierter Embolie beobachtet werden. In dem vorliegenden Fall ist der Embolus der *Cysticercus*.

Bezugnehmend auf die oben erwähnten Versuche von Bernhard Fischer, erkläre ich die Genese des Tumors¹⁾, welchen die subkutane Implantation des Schwanzteiles vom *Cysticercus fasciolaris* hervorrief, durch die giftigen und chemotaktischen Eigenschaften der „Lipoidsubstanzen“ und durch die Fremdkörperwirkung der „Kalkkörper“, die aus dem implantierten *Cysticercus*-Stück in den Organismus des Versuchstieres einwandern. Erliegen die Versuchstiere vorzeitig den toxischen Wirkungen der „Lipoidsubstanzen“, so erkennt man durch die Untersuchung der Implantationsstelle, daß das Experiment zunächst mit starker Anhäufung von Rundzellen, insbesondere von Lymphocyten beantwortet wird, wie ich in der vorangegangenen Publikation (vgl. Centralbl. f. Bakteriologie. Bd. XLIX. 1909. p. 83) dargelegt habe.

Im übrigen ist für den Fall des *Bothriocephalus latus*²⁾ jüngst nachgewiesen worden, daß die giftigen „Lipoidsubstanzen“ der Helminthen echte Fettkörper, Cholesteride der Oelsäure, sind.

Nachdruck verboten.

Ueber die Verteilung des Lyssavirus im Nervensystem.

[Hygienisches Institut der Kgl. Universität Sassari.]

II. vorläufige Mitteilung.

Von Prof. Claudio Ferri.

Das Studium der Virulenz der verschiedenen Nervensystemteile scheint mir aus verschiedenen Gründen von ungewöhnlicher Wichtigkeit, und zwar:

1) Um die Verbreitung des Lyssavirus im Nervensystem mit der Verbreitung der Negrischen Körperchen in Verbindung zu setzen.

2) Um den Mechanismus der Symptome und des Todes bei der Wutkrankheit zu erklären.

3) Um die tödliche minimale Dosis der Nervensystemteile von verschiedenen lyssakranken Tieren bestimmen zu können. Es ist selbstverständlich, daß, wenn hervorragende Virulenzunterschiede in den verschiedenen Nervensystemteilen bestehen, es nicht gleichgültig wäre, die Nervensystemteile zu vergleichen und stets die identischen Teile einander gegenüberzustellen.

4) Um zu entscheiden, ob irgendeine Beziehung zwischen der immunisierenden Wirkung der verschiedenen Nervensystemteile und der Virulenz derselben vorhanden ist oder nicht. Ich habe neuerdings bewiesen, daß, während die normale Nervensubstanz in toto eine hochgradige immunisierende Wirkung für Muriden besitzt, die weiße und die

1) Centralbl. f. Bakteriologie. Abt. I. Orig. Bd. XLIX. 1909. p. 84; ebenda, Bd. XLVII. 1908. p. 444.

2) Faust und Tallqvist, Ueber experimentelle Anämieen. (Physik.-med. Gesellschaft in Würzburg. Sitzung am 5. Nov. 1908.)

Inkubationszeit	Versuchstiere		Versuchte Nervensystem-teile	Erfolg	
	Art	Zahl		Zeit der Paralyse	Zeit des Todes
2. 07 gl.	weiße Maus	1	Lobus frontalis	20. 2. 12 Uhr nachm.	21. 2. 4 Uhr nachm.
"	" "	1			überlebt
"	" "	1			"
3. 07 gl.	weiße Maus	1	Lobus occipitalis		überlebt
"	" "	1			"
"	" "	1			"
11. 07 gl.	weiße Maus	1	Lobus occipitalis		überlebt
"	" "	1			"
"	" "	1			"
2. 07 gl.	weiße Maus	1	Lobus occipitalis	13. 12. 4 Uhr nachm.	14. 12. 7 Uhr nachm.
"	" "	1		dgl.	dgl.
"	" "	1		13. 12. 12 Uhr vorm.	13. 12. 4 Uhr nachm.
2. 07 gl.	weiße Maus	1	Cerebellum	13. 2. 8 Uhr vorm.	13. 2. 10 ¹ / ₄ Uhr vorm.
"	" "	1		dgl.	13. 2. 10 ¹ / ₄ Uhr vorm.
"	" "	1		"	13. 2. 10 ³ / ₄ Uhr vorm.
2. 07 gl.	weiße Maus	1	Cornu Ammonis	13. 2. 8 Uhr vorm.	13. 2. 10 Uhr vorm.
"	" "	1		dgl.	13. 2. 11 Uhr vorm.
"	" "	1		"	13. 2. 11 ¹ / ₄ Uhr vorm.
3. 07 gl.	weiße Maus	1	Nucleus caudatus		überlebt
"	" "	1			"
"	" "	1			"
11. 07 gl.	weiße Maus	1	Nucleus caudatus		überlebt
"	" "	1			"
"	" "	1			"
12. 07 gl.	weiße Maus	1	Nucleus caudatus	13. 12. 4 Uhr nachm.	14. 12. 7 Uhr nachm.
"	" "	1			überlebt
"	" "	1			"
3. 07 gl.	weiße Maus	1	Weiße Hirnsub-stanz		überlebt
"	" "	1			"
"	" "	1			"
11. 07 gl.	weiße Maus	1	Weiße Hirnsub-stanz		überlebt
"	" "	1			"
"	" "	1			"
12. 07 gl.	weiße Maus	1	Weiße Hirnsub-stanz		überlebt
"	" "	1			"
"	" "	1			"
1. 08 gl.	weiße Maus	1	Weiße Hirnsub-stanz		überlebt
"	" "	1			"
"	" "	1			"
"	" "	1			"
"	" "	1			"
"	" "	1			"
2. 07 gl.	weiße Maus	1	Medulla oblongata	13. 2. 8 Uhr vorm.	13. 2. 10 ¹ / ₄ Uhr vorm.
"	" "	1		dgl.	13. 2. 10 ¹ / ₂ Uhr vorm.
"	" "	1		"	13. 2. 11 Uhr vorm.
3. 07 gl.	weiße Maus	1	Medulla dorsalis		überlebt
"	" "	1			"
"	" "	1			"
11. 07 gl.	weiße Maus	1	Medulla dorsalis	Tod gefunden	Nach 3 Tagen ohne Paralyse
"	" "	1		27. 11. 7 Uhr nachm.	28. 11. 7 Uhr vorm.
"	" "	1		26. 11. 7 Uhr vorm.	27. 11. 7 Uhr nachm.

Inokulationszeit	Versuchstiere		Versuchte Nervensystemteile	Erfolg	
	Art	Zahl		Zeit der Paralyse	Zeit des Todes
6. 12. 07	weiße Maus	1	Medulla dorsalis	14. 12. 7 Uhr vorm.	überlebt
dgl.	" "	1			14. 12. 7 Uhr nachm.
"	" "	1			überlebt
24. 1. 08	weiße Maus	1	Medulla dorsalis	2. 2. 7 Uhr vorm.	2. 2. 10 Uhr vorm.
dgl.	" "	1		dgl.	4. 2. 7 Uhr vorm.
"	" "	1		"	4. 2. 7 Uhr nachm.
"	" "	1		"	4. 2. 7 Uhr nachm.
"	" "	1		7. 2. 12 Uhr vorm.	7. 2. 5 Uhr nachm.
"	" "	1		"	überlebt
"	" "	1		"	7. 2. 5 Uhr nachm.
"	" "	1		"	überlebt
6. 2. 07	weiße Maus	1	Medulla lumbalis	15. 2. 7½ Uhr nachm.	16. 2. 8 Uhr vorm.
dgl.	" "	1			überlebt
"	" "	1			"

graue Nervensubstanz dagegen, wenn sie getrennt sind, fast kein vaccinierendes Vermögen entfalten. Wenn man nun diese Tatsache bestätigen würde, d. h. daß die graue Lyssanervensubstanz sehr virulent, aber fast ohne immunisierende Kraft ist, so müßte die Pasteursche Theorie der antirabischen Behandlung fallen und die verschiedenen Schutzimpfungsmethoden modifiziert werden.

Versuchsmethode. Bei dieser 2. Versuchsreihe befolgte ich dieselbe Methode, wie bei der vorigen. Ich verglich nämlich untereinander die Virulenz der verschiedenen Nervensystemteile, indem ich für jede derselben die tödliche Minimaldosis bestimmte.

Von jedem Nervensystemteile wurden deswegen Verdünnungen zu 1:50 000—40 000—30 000—20 000 usw. bereitet und ihr infizierendes Vermögen durch subkutane Impfungen auf Mäuse geprüft. Diese Tiere sind, wie ich in meiner früheren Arbeit bewiesen habe, gegen das fixe Virus unseres Instituts noch bei einer Verdünnung von 1:50 000 empfänglich.

Zu den gegenwärtigen Untersuchungen über das Cerebrospinalnervensystem von Hunden, die infolge einer subduralen fixen Virusinfektion zugrunde gingen, wurden bis jetzt folgende Nervensystemteile untersucht: 1) Lobus frontalis, 2) Lobus occipitalis, 3) Cerebellum, 4) Cornu Ammonis, 5) Nucleus caudatus, 6) weiße Hirnsubstanz, 7) Medulla oblongata, 8) Medulla dorsalis, 9) Medulla lumbaris.

Der Kürze wegen habe ich in den obenstehenden Tabellen die Untersuchungen zusammengefaßt:

Ergebnisse und Schlußfolgerungen. 1) Der größeren Anhäufung der Lyssakeime nach könnten die verschiedenen untersuchten Nervensystemteile, wenn man mit der virulenteren anfängt, in folgende Ordnung gestellt werden:

a)	Cornu Ammonis	}	tödliche Minimaldosis 1:50 000
	Cerebellum		
	Medulla oblongata		
b)	Medulla dorsalis	"	" 1:40 000
c)	Lobus frontalis, Medulla lumbalis	"	" 1:30 000
d)	Lobus occipitalis, Nucleus caudatus	"	" 1:20 000
e)	Weißer Hirnsubstanz	"	" 1:1 000

Das Cornu Ammonis, das Cerebellum und die Medulla oblongata wären also von gleicher Virulenz und zu gleicher Zeit die an Lyssakeimen

reichsten Nervensystemteile; es folgten dann die Medulla dorsalis, dann von gleicher Virulenz der Lobus frontalis und die Medulla lumbalis, nachher der Lobus occipitalis und der Nucleus caudatus und zuletzt der an Lyssakeimen ärmste Teil, die weiße Hirnsubstanz. Diese Tatsache ist, wie wir sehen werden, von spezieller Wichtigkeit.

2) Um im Nervensystem die Verbreitung der Lyssakeime mit jener der Negrischen Erreger zu vergleichen, stellte ich eine Tafel zusammen, aus welcher die approximative Verbreitung der Negrischen Körperchen im Nervensystem ersichtlich ist.

Diese Tafel wurde auf Grund der von verschiedenen Autoren über Negrische Körperchen veröffentlichten Abhandlungen und der zahlreichen histologischen Untersuchungen, die im hiesigen Institute über denselben Gegenstand durchgeführt wurden, zusammengestellt.

Der Kürze halber werde ich die obengenannte Tafel resumieren:

Die nachstehenden Prozentsätze, die aus den erhaltenen positiven Resultaten ausgerechnet worden sind, haben nur den Zweck, die Unterschiede deutlicher darzulegen:

a) Cornu Ammonis	11 : 11 = 100 Proz.
b) Cortex cerebialis	8 : 9 = 87 „
c) Medulla oblongata, Medulla spinalis	4 : 5 = 80 „
d) Cerebellum	6 : 9 = 66 „
e) Thalamus opticus	1 : 4 = 25 „
f) Nucleus caudatus	1 : 5 = 20 „

Obwohl wir das Nervensystem von an fixem und an Straßenvirus gestorbenen Tieren verglichen haben, kann man im ganzen sagen, daß die größere Anhäufung von Negrischen Körperchen mit der größeren Virulenz derselben Nervensystemteile übereinstimmt. In beiden Fällen findet sich das Cornu Ammonis am Anfang, der Nucleus caudatus und die weiße Hirnsubstanz am Ende der Reihe.

3) Die Verbreitung der Lyssakeime, die fast in allen wichtigeren Nervensystemteilen stattfindet, genügt, um den Tod an Lyssa zu erklären, was nicht der Fall wäre, wenn das Cornu Ammonis oder andere weniger vitale Teile allein der Sitz der Infektion wären.

4) Aus allen diesen Versuchen ergibt sich, daß, wenn wir genaue Vergleiche zwischen der Virulenz des Nervensystems bei verschiedenen Tieren anstellen, wir stets die virulentesten Nervensystemteile wählen und bei der Entnahme derselben sorgfältig die weiße Substanz vermeiden müssen.

5) Endlich beweist die Tatsache, daß die ärmste weiße und die an Lyssakeimen reichste graue Nervensubstanz, wie ich schon in einer anderen Arbeit bewiesen habe, die gleiche antirabische Kraft für Muriden besitzt, und daß dieselbe viel niedriger als die immunisierende Wirkung der beiden vereinigten Nervensubstanzen ist, noch einmal, daß das Schutzimpfungsvermögen des Pasteurschen Impfstoffs nicht allein vom Lyssavirus und seinen Produkten abhängig ist.

Sassari, 24. März 1908.

Nachdruck verboten.

Experimentelle und histologische Beobachtungen über die Milch und die Amnionflüssigkeit eines an der Tollwut gestorbenen Schafes.

[Experimentelles Institut der Königl. Universität Sassari
(Leiter Prof. C. Fermi).]

Von Dr. R. Repetto, Assistent.

Anfangs Oktober vorigen Jahres wurden in einem Schafstalle bei Osilo 24 Schafe von einem wutkranken Hunde gebissen. 14 von diesen, die schwerere Verletzungen davongetragen hatten, starben an der Wut nach ungefähr 25 Tagen.

Der Hirt teilte mir mit, daß nur 2 die Zeichen der Rabies furiosa darboten und Personen anzugreifen versuchten.

Die anderen hingegen rissen sich die Wolle aus und kauten sie. Später trat Lähmung des Hinterviertels auf, die fortdauernd zunahm, bis die Tiere umstürzten und verendeten.

An diesen Schafen, die außerdem trächtig waren, nahm ich folgende Versuche vor:

1) Forschung auf Negrische Körperchen im Ammonshorn des Schafes.

2) Forschung auf Negrische Körperchen im Ammonshorn des Fötus.

3) Forschung auf Wutvirus in der aus dem Euter des Schafes gepreßten Milch.

4) Forschung auf Wutvirus in der amniotischen Flüssigkeit.

Forschung auf Negrische Körperchen im Ammonshorne des Schafes. In den am Ammonshorn des Schafes ausgeführten Schnitten fanden sich bei der mikroskopischen Beobachtung zahlreiche Negrische Körperchen von der Größe von 1—7 μ . In einem Falle kann man selbst 25, und in einer Zelle 1—7 zählen; das morphologische Aussehen ist dem gleich, welches man in den Hirnschnitten eines wutkranken Hundes antrifft.

Zwei weiße, subkutan mit einem Teile dieses Ammonshornes eingespritzte Ratten begannen am 10. November Lähmung des Hinterviertels aufzuweisen und starben am 11. an der Tollwut, d. h. 14 Tage nach der Infektion.

Forschung auf Negrische Körperchen im Ammonshorn des Fötus. In den Präparaten, die dem Ammonshorn des Fötus entstammten, habe ich, wie zu erwarten war, keine Negrischen Körperchen gefunden. 2 Ratten, die subkutan mit einem Teile dieses Ammonshornes und dem verlängerten Mark geimpft worden waren, blieben am Leben.

Forschung auf Wutvirus in der Milch. 5 weißen Mäusen wird subkutan 1 ccm Milch eingespritzt, welche aus dem Euter des Schafes gepreßt worden war.

Die 5 Mäuse blieben am Leben.

Forschung auf Wutvirus in der Amnionflüssigkeit. 5 weißen Mäusen wird subkutan 1 ccm Amnionflüssigkeit vom Schafe eingespritzt.

Die 5 Tiere blieben am Leben.

Schlußfolgerungen: Diese Untersuchungen ergaben:

- 1) Daß das Wutvirus nicht von der Mutter auf den Fötus übergeht, wie dies bereits Pasteur, Celli, L. De Blasi und Zagari bewiesen hatten, während Peroncito, Carità und Loir das Gegenteil behauptet hatten.
- 2) Daß die Negrischen Körperchen nicht durch das placentäre Filter dringen und folglich sich nicht im Fötus vorfinden.
- 3) Daß die Amnionflüssigkeit kein Wutvirus enthält.
- 4) Daß die Milch kein Wutvirus enthält, wie bereits Pasteur, Celli, L. De Blasi und Zagari nachgewiesen hatten.

Nachdruck verboten.

Experimentelle Untersuchungen über die Infektionsfähigkeit der Vaccinestoffe.

[Aus dem Hygienischen Institut der Kgl. Universität in Turin
(Direktor: Prof. L. Pagliani).]

Von Dr. **Pugliese** und **Debenedetti**.

Die von Prof. Prowazek angestellten Untersuchungen über den Vaccineerreger haben gezeigt, daß die Lymphe, mit einer physiologischen Kochsalzlösung verdünnt, noch die Aktivität bis zur Proportion 1:2000 besitzt.

Prof. Prowazek, welcher den vorausgesetzten Vaccineerreger in dem Hornhautepithel suchte, kam zu der Ueberzeugung, daß der Erreger sich nicht nur in dem Protoplasma der Zellen, sondern auch zwischen den Zellen selbst befindet.

Diese Annahme wurde von ihm durch folgendes Experiment unterstützt:

Er schnitt eine 16 Stunden bis einige Tage vorgeimpfte Hornhaut aus, und legte dieselbe während ungefähr 8—10 Stunden in ein sterilisiertes Gefäß. Nach einiger Zeit schwoilen die Zellen an, worauf er sie in sterilisierter physiologischer Kochsalzlösung schüttelte und die Flüssigkeit durch ein 4-faches Filtrierpapier filtrierte, auf welchem die Zellen zurückblieben.

Die filtrierte Lösung, in welcher durch mikroskopische Beobachtung keine Zellen gefunden wurden, ergaben positive Resultate beim Vaccinieren.

Die auf dem Papier gebliebenen Zellen verdünnte Prowazek mit einer Trypsinlösung und filtrierte sie, wie oben gesagt, durch 4-faches Filtrierpapier. Das aufgelöste Protoplasma drang durch das Papier, auf welchem nur die Zellkerne zurückblieben. Die mit diesen Bestandteilen gemachten Impfungen ergaben nur negative Resultate.

Wir wollten die Prowazekschen Versuche wiederholen, vermuteten jedoch, daß infolge seiner zu delikaten Technik ungenaue Resultate erzielt werden könnten. Wir gingen von der Annahme aus, daß Prowazek und die anderen Autoren, welche sich mit dieser Frage beschäftigten, unter dem Namen vaccinische Lymphe denjenigen komplexen Teil der Vaccinepustel verstehen, welcher aus dem Tier durch Auskratzen bei der gewöhnlichen Vorbereitung der Vaccine entfernt wird. Wir wollten daher bei unserem Experimente den soliden und schorffartigen von dem serösen

Teile trennen, welcher aus den Vaccinepusteln austritt, sobald das Tier auf den Operationstisch gebunden ist.

Das Impfmaterial wurde direkt vom Kalbe gewonnen.

Die Vaccinepulpe wurde in sterilisierte Petri-Schalen aufgenommen, die seröse Masse, welche während der Materialvorbereitung austritt, wurde in sterilisierten Röhrchen aufbewahrt.

Nachdem wir das solide Material mit sterilisierten Glasstaub zerrieben hatten, machten wir die folgenden Lösungen:

1 g Vaccinepulpe + 10 ccm	physiologische Kochsalzlösung	= $\frac{1}{10}$
1 ccm dieser Lösung + 4 ccm	"	= $\frac{1}{50}$
1 " Verdünnung zu $\frac{1}{10}$ + 9 ccm	"	= $\frac{1}{100}$
1 " " " 1:100 + 2 ccm	"	= 1:300
1 " " " 1:100 + 5 "	"	= 1:600
1 " " " 1:100 + 9 "	"	= 1:1000

Nach gleicher Art verdünnten wir das Serum mit physiologischer Kochsalzlösung zu 1:25, 1:50, 1:100, 1:300, 1:600.

Mit dieser Flüssigkeit vaccinierten wir Kaninchen durch einfache Hornhaut Einschnitte mittels Impflanzetten, welche in diese Lösung getaucht waren. Nach stattgefundener Impfung schütteten wir noch einige Tropfen der Lösung auf die Hornhaut und machten eine leichte Massage mit dem Augenlide.

Unsere erzielten Resultate sind folgende:

Mit dem soliden Material hatten wir in allen Fällen ein positives Resultat, welches durch sofortige Untersuchung des Epithels (mittels Hornhautauskratzung und Untersuchung im dunkeln sowie im hellen Feld, wobei wir immer deutlich die beweglichen Volpinoschen Körperchen fanden) und Einschließung und Färbung der Hornhaut mit eisenhaltigem Hämatoxylin nachgewiesen wurde. Hierbei wurden immer sehr deutlich die Guarnierischen Körperchen und oft in diesen die genannten Initialkörper von Gorini-Prowazek gefunden.

Mit dem verdünnten Serum hatten wir keinen Erfolg, während die Impfung immer positiv mit unverdünntem Serum war. — Bemerkenswert ist hierbei, daß das unverdünnte Serum nach mikroskopischer Untersuchung eine gewisse Anzahl von Cellularelementen und kleine Anhäufung von Ueberbleibseln zeigte. Wir wollten dieses Hindernis aus dem Wege räumen, jedoch ist die Quantität des Serums, das man an einem Tiere gewinnen kann, so gering, daß es ganz unmöglich ist, dasselbe zu filtrieren. — Unsere Erfahrungen ergaben also, daß, wie schon von Herrn Prowazek erwiesen wurde, das Vaccinematerial relativ ziemlich stark infizierend ist, da es auch in ziemlich großer Verdünnung noch wirkt, und daß der Vaccineerreger, wenn auch nicht ausschließlich, so doch zum größten Teile im Inneren der Zellen existiert. Diese Beobachtung stimmt mit den bisherigen morphologischen Ergebnissen überein, die uns vermuten lassen, daß das Virus, wenn auch nicht ganz, so doch hauptsächlich endocellulär ist.

Wir danken hier Herrn Professor Abba, der uns lebenswürdigerweise das Material des hiesigen Impfinstitutes zur Verfügung stellte, und Herrn Professor Volpino, der uns mit seiner Hilfe und seinem Rat bereitwilligst unterstützt hat.

Literatur.

- 1) Prowazek, Untersuchungen über das Wesen des Vaccinerregers. (Deutsche med. Wochenschr. 1905. No. 19. p. 752.)
- 2) —, Untersuchungen über die Vaccine. I und II. (Arbeit. a. d. Kaiserl. Gesundheitsamte. Bd. XXII. 1905. p. 3; Bd. XXIII. 1906. p. 62.)
- 3) Volpino, Corpuscoli mobili specifici dell'infezione vaccinica nell'epitelio corneale des conigli. (Rivista d'Igiene e Sanità pubblica. 1907. p. 737.)
- 4) —, Ulteriore ricerche ecc. (Centralbl. f. Bakteriologie. Abt. I. Orig. Bd. XLIX. 1909. p. 197.)
- 5) Prowazek, Untersuchungen über die Vaccine. (Arbeit. a. d. Kais. Gesundheitsamte. Bd. XXVI. 1907. p. 1.)
- 6) Gorini, Ueber die bei der mit Vaccine ausgeführten Hornhautimpfung vorkommenden Zelleinschlüsse usw. (Centralbl. f. Bakteriologie. Abt. I. Bd. XXVIII. 1900. No. 8—9.)
- 7) —, Ueber die bei den Hornhautvaccineherden vorkommenden Zelleinschlüsse. (Centralbl. f. Bakteriologie. Abt. I. Bd. XXIX. No. 14.)
- 8) —, Dieselbe Abhandl. (Centralbl. f. Bakteriologie. Abt. I. Bd. XXXII. 1902. No. 2—3.)
- 9) Foà, Cytoryctes vaccinae. (Rendic. Acc. Lincei. T. XII. 1903. p. 64—72, 88—94.)
- 10) Monti, Ueber die Aetiologie der Variola. (Mitteilungen a. d. XI. Internat. med. Kongreß zu Rom. (Centralbl. f. Bakteriologie. Bd. XVI. 1894.)
- 11) Negri, Ueber Filtration des Vaccinevirus. (Centralbl. f. Bakteriologie. Abt. I. Orig. Bd. XXXVI. p. 748.)
- 12) Casagrandi, Studi sul vaccino. (Annali d'Igiene speriment. (T. XVI. 1906. p. 115.)
- 13) Calmette et Guérin, Recherches sur la vaccine expérimentale. (Annales Inst. Pasteur. 1901.)
- 14) Guérin, Contrôle de la valeur des vaccins jennériens par la numération des éléments virulents. (Annales Institut Pasteur. 1905. p. 317.)
- 15) De Waele u. Sugg, Experimentelle Untersuchungen über die Kuhpockenlymphe. (Centralbl. f. Bakteriologie. Abt. I. Orig. Bd. XXXIX. 1905. p. 46—142.)
- 16) Santori, Filtrazione, diluizione e trituratione del vaccino. (Annali d'Igiene speriment. T. XIV. 1904. Heft 4. p. 583.)
- 17) Bosc, Les maladies bryocytiques. (Centralbl. f. Bakteriologie. Abt. I. Orig. Bd. XXXIX. 1905.)

Nachdruck verboten.

Eine neue Spirochäte aus dem Süßwasser.

[Aus dem Königl. Institut für Infektionskrankheiten zu Berlin.]

Von Dr. K. Nägler.

Mit 1 Tafel.

Bei der Untersuchung von Schlammproben aus dem sogenannten „faulen See“ fiel mir eine Spirochäte auf, die in ihren Kennzeichen mit keiner der bisher bekannten Arten übereinstimmt.

Obige Schlammprobe, die unser Institut der Freundlichkeit Frl. Dr. Zuelzers verdankt, und die im Juni zur Untersuchung kam, enthielt damals die *Spirochaeta plicatilis* Ehrenberg. Bei der Wiederaufnahme der Untersuchung durch mich zu Anfang Januar fand ich keine *Spirochaeta plicatilis* mehr, wohl aber sehr zahlreiche die zu beschreibende Art.

Diese Spirochäte stimmt in ihrem Bau nicht mit der *Spirochaeta plicatilis* überein, da sie eine glatte Kontur besitzt ohne die üblichen ausgeprägten Spirochätenwindungen (Fig. 1—6). Sie zeichnet sich vor allem aus durch ihre kolossale Flexibilität, mit der sie ständig ihre Gestalt wechselt. Bald gleitet sie in Wellenform dahin, bald rollt sie sich ein oder schnellt sich korkzieherartig vorwärts und dreht und

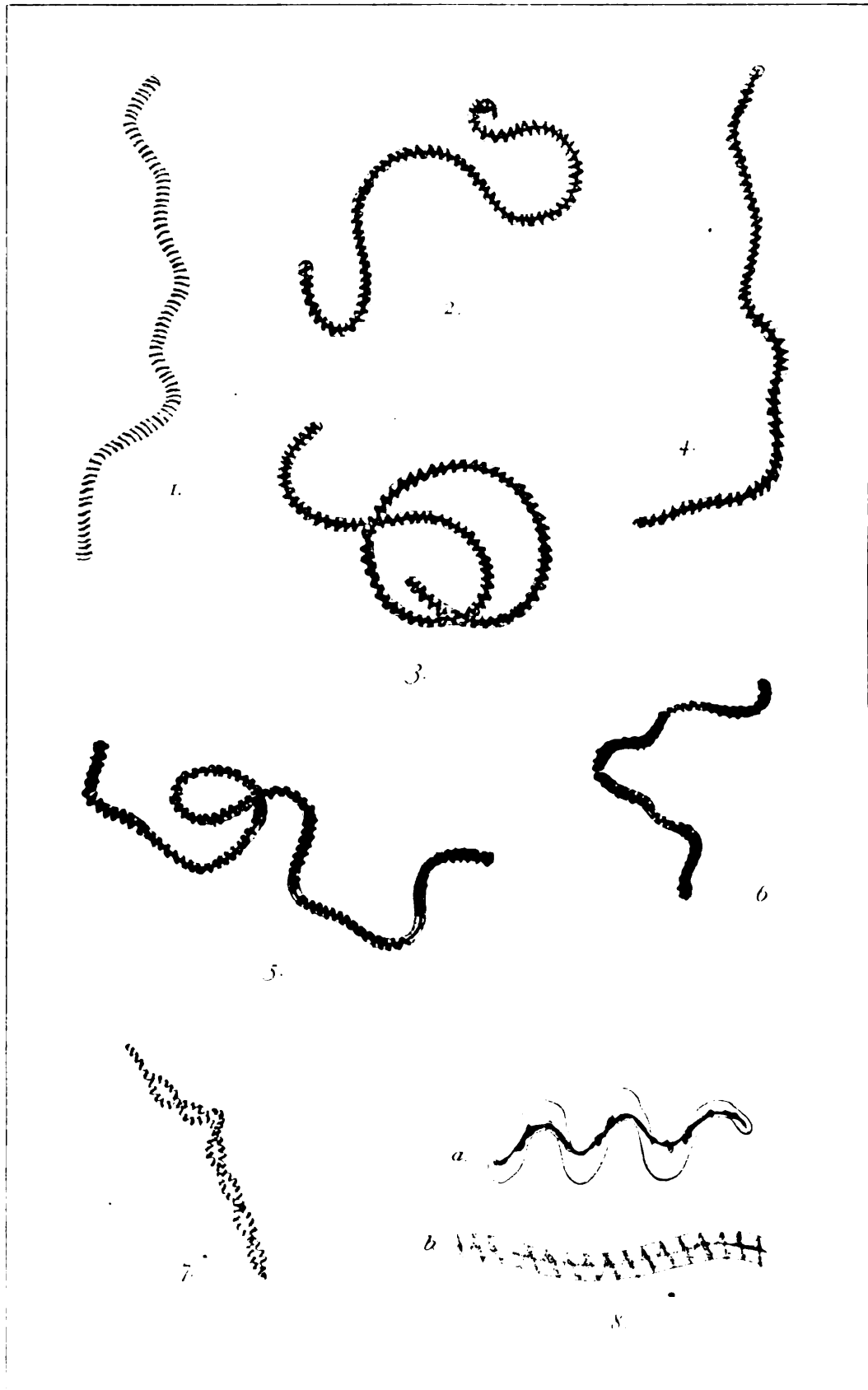
windet sich nach allen Seiten. Selten habe ich sie in relativem Ruhezustande gesehen, wo sie einigermaßen die bekannte Spirochätenform annimmt — aber mit unregelmäßigen Windungen. Die Enden sind abgerundet. Die Länge variiert stark zwischen 20—70 μ . Nicht selten sieht man auf den Präparaten, die durch Fixation nach Flemming mit langsamem Antrocknen und durch Färbung nach Heidenhain oder Giemsa hergestellt wurden, überaus lange Spirochäten, die an verschiedenen Stellen gewissermaßen unterbrochen zu sein scheinen, so daß man auf die Vermutung kommt, es handle sich um Teilungsstücke, die durch Proliferation abfallen. Des öfteren liegt diesen helleren Stellen in der Spirochäte eine Unterbrechung der um die Spirochäte verlaufenden und noch zu besprechenden Periplastfibrille und des eventuellen Kernstabes zugrunde, was einerseits auf mangelhafter Konservierung, andererseits auf obiger Annahme beruhen kann. Wahrscheinlich beruht die Sache auf einer einseitigen unregelmäßigen Kontraktion der Periplastfibrille, so daß die Stellen, wo letztere auseinandergezogen ist, hell erscheinen. Kleinere Teilungsstücke, die gefunden wurden, können ja auch durch mechanisches Zerreißen gebildet worden sein.

Eine undulierende Membran ist nicht vorhanden. Sie wird ersetzt durch die in der Oberfläche des Ektoplasmas verlaufende Periplastfibrille, die einen Spiralfaden bildet und dieser Form ihr so überaus charakteristisches Gepräge verleiht, da diese Bänderung schon im Leben bei Oelimmersion mit aller Deutlichkeit zu sehen ist (siehe Fig. 1). Periplastfortsätze werden nicht gebildet, ebensowenig Geißeln.

Bei der Färbung verdeckt diese Periplastfibrille sehr oft den in der Mitte des Plasmas verlaufenden Kernstab, vor allem bei der gewöhnlichen Heidenhain-Methode, indem der Farbstoff sich in den Windungen der Periplastfibrille festsetzt und das Plasma überfärbt, so daß der Kernstab nicht zur Geltung kommt. Bei weiterer Differenzierung oder noch besser nach der abgekürzten Hämatoxylinmethode nach Rosenbusch (1908) tritt der Kernstab klar hervor als in der Körperachse verlaufendes, meist homogenes Gebilde, das hier und da, besonders auch an den oben erwähnten helleren Stellen oft körnelige Struktur annehmen kann. Die Giemsa-Methode färbt auch die Periplastfibrille derart rot, daß der Kernstab meist nicht zu erkennen ist. Einzelheiten waren nicht wahrzunehmen, wie etwa Chromosomenbildung bei der *Spirochaeta balbianii* (Perrin 1906).

Trotz vieler Präparate und vielen Suchens habe ich nur ein Stadium gefunden, das eventuell für eine Längsteilung spricht (Fig. 7). — Aus alledem geht wohl mit Sicherheit hervor, daß wir es zwar mit einer Spirochäte zu tun haben, daß aber die Charaktere des Genus *Spirochaeta* für diese neue Form nicht ganz passen (Ehrenberg 1838, Schaudinn 1905 u. 1907). Es fehlt einerseits eine typische undulierende Membran, andererseits ist die Periplastfibrille mit ihren regelmäßigen und auffallenden Windungen so charakteristisch, daß ich mich für berechtigt halte, zum mindesten eine neue Art hierfür aufzustellen, „*Spirochaeta flexibilis*“, falls man nicht sogar eine neue Gattung bilden will. In letzterem Falle würde ich den Genusnamen „*Spirophis*“ vorschlagen. Ich verweise auf das Schema der Charakterisierung dieser Art gegenüber der am nächsten verwandten *Spirochaeta pliocatilis* (Fig. 8).

Spirochaeta flexibilis würde in verwandtschaftlicher Beziehung



Nägler del.

Verz. von Gustav Fischer in Jena

1. 6000 X. 2. 1200 X.

als ein echtes Protozoon am nächsten den freilebenden Spirochäten stehen: Zunächst *Spirochaeta plicatilis* Ehrenberg, dann *Spirochaeta balbianii* Certes, *Spirochaeta anadontae* Keysselitz (1906) und *Spirochaeta pinnae* Gonder (1908). Die saprophytischen und parasitären Spirochäten — letztere teils im Blut, teils im Gewebe — dürften eine Gruppe für sich bilden. Immerhin läßt sich Sicheres über die Verwandtschaft und Abstammung der Spirochäten, die eventuell, wie auch Lühe und Hartmann hervorgehoben haben, überhaupt keine einheitliche Gruppe bilden und dann in verschiedene neue Genera aufgeteilt werden müßten und die von Hartmann (1907) vorläufig als Anhang zu den Binucleaten gestellt werden, nicht sagen ohne Kenntnis von Uebergangsformen, wie ja solche in einer Richtung allerdings in der Gattung *Leucocytozoon* angedeutet sind.

Literatur.

- Ehrenberg, Die Infusionstierchen als vollkommene Organismen. Leipzig 1838.
 Gonder, R., Spirochäten aus dem Darmtraktus von Pinna: *Spirochaeta pinnae* n. sp. und *Spirochaeta Hartmanni* n. sp. [Vorl. Mitt.] (Centralbl. f. Bakt. etc. Abt. I. Orig. Bd. XLVII. 1908.)
 Hartmann, M., Das System der Protozoen. Zugleich vorläufige Mitteilung über Proteosoma (Labbé). (Arch. f. Protistenk. Bd. X. 1907.)
 Keysselitz, G., Beschreibung von *Spirochaeta anadontae* n. sp. (Arb. a. d. Kaiserl. Gesundheitsamte. Bd. XXIII. 1906.)
 Lühe, Handb. d. Tropenkrankheiten.
 Perrin, Researches upon life-history of *Trypanosoma balbianii*. (Arch. f. Protistenk. Bd. VII. 1906.)
 v. Prowazek, S., Vergleichende Spirochätenuntersuchungen. (Arb. a. d. Kaiserl. Gesundheitsamte. Bd. XXVI. 1907.)
 Rosenbusch, F., Kern und Kernteilung bei *Trypanosomen* und *Halteridium*. [Vorl. Mitt.] (Arch. f. Schiffs- u. Tropenhyg. Bd. XII. 1908.)
 Schaudinn, F., Zur Kenntnis der *Spirochaeta pallida*. (Dtsche med. Wochenschr. 1905.)
 Schaudinn, F., Zur Kenntnis der *Spirochaeta pallida* und anderer Spirochäten. [Nachlaß.] (Arb. a. d. Kaiserl. Gesundheitsamte. Bd. XXVI. 1907.)
 Zettnow, Färbung und Teilung bei Spirochäten. (Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskr. Bd. LII. 1906.)

Tafelerklärung.

- Alle Figuren sind mit dem Zeiss'schen Zeichenapparat entworfen. Apochromat 2 mm; Fig. 7 mit Ok. 8, Fig. 1—6 mit Ok. 12. Vergrößerung ca. 2200 \times .
 Fig. 1. *Spirochaeta flexibilis* nach dem Leben.
 Fig. 2—6. Nach Heidenhain-Präparaten.
 Fig. 7. Eventuelles Teilungsstadium nach Giemsa.
 Fig. 8. Schema des Baues von a) *Spirochaeta plicatilis* (nach Schaudinn), b) *Spirochaeta flexibilis*.

Nachdruck verboten.

Neue Helminthen aus Deutsch-Südwest-Afrika.

Von Dr. v. Linstow, Göttingen.

Mit 4 Figuren.

Herr Dr. Scheben, bekannt durch seine schönen Untersuchungen an den Spermatozoen von *Ascaris megalocephala* (Zeitschr. f. wissenschaftl. Zoolog. Bd. LXXIX. 1905), sandte mir aus Rehoboth in Deutsch-Südwest-Afrika eine Anzahl dort gesammelter Helminthen, welche zum Teil neu sind.

Ueber die Helminthen aus unseren deutsch-afrikanischen Kolonien ist erst sehr wenig bekannt. Aus Deutsch-Ostafrika erhielt ich im Jahre 1900 von Stabsarzt Dr. Fülleborn eine größere Anzahl Helminthen, 23 Nematoden-, 5 Gordius- und Mermis-, 1 Acanthocephalen-, 1 Trematoden- und 10 Cestodenarten, die ich in der Jenaischen Zeitschr. f. Naturwissenschaften. Bd. XXXV. 1900 beschrieben habe; bei dieser Gelegenheit möchte ich richtigstellen, daß die auf p. 415 beschriebene Art aus Numida Rikwae, acuticauda, kein *Oxysoma*, sondern eine *Heterakis* ist. Aus dem englischen Westafrika beschrieb ich im Centralbl. f. Bakt. etc. Abt. I. Orig. Bd. XXXVI. 1904. p. 379—383 3 Arten aus *Erinaceus albiventris*; daß die p. 382—383 beschriebene Art *Hymenolepis abortiva* heißen muß, habe ich schon früher bemerkt.

Heterakis Schebeni n. sp.

Fig. 1.

aus dem Darm des Erdmarders, *Cynictis penicillata* Gray.

Cuticula querverringelt; die runde Mundöffnung führt in einen flachen Mundbecher; das Kopfende ist abgerundet; hinter dem Mundbecher stehen seitlich 2 rundliche Chitinplatten; der Exkretionsporus ist weit nach vorn gerückt, er teilt die Länge des Oesophagus von vorn nach hinten im Verhältnis von 4 : 9, der Nervenring von 1 : 4; der Oesophagus, welcher beim Männchen $\frac{1}{5}$, beim Weibchen $\frac{1}{6}$ der ganzen Tierlänge einnimmt, ist am Ende rundlich verdickt.

Das Männchen ist 5,8 mm lang und 0,23 mm breit; der Schwanz mißt $\frac{1}{37}$ der ganzen Länge; die gleichen Spicula sind 0,53 mm lang und hinten zugespitzt; am Schwanzende stehen jederseits 3 Papillen, 2 präanal, und von den postanal ist die vorletzte lateral gestellt, die letzte ist eine Doppelpapille, der Saugnapf ist schlitzförmig.

Beim Weibchen beträgt die Länge 7,3 mm und die Breite 0,32 mm; der zugespitzte Schwanz ist $\frac{1}{15}$ der Gesamtlänge groß; die Vagina teilt die Körperlänge von vorn nach hinten im Verhältnis von 3 : 4; die Geschlechtsorgane sind vom Ende des Oesophagus bis zum Anus verbreitet;

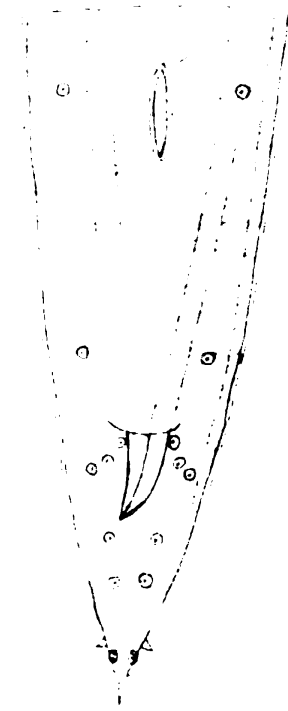


Fig. 1.
Männliches Schwanzende
von *Heterakis Schebeni*.

die Eier enthalten einen entwickelten Embryo und sind sehr dünn-schalig; die Länge beträgt 0,070 mm bei einer Breite von 0,047 mm.

Aus einem Raubtier war bisher noch keine *Heterakis*-Art bekannt.

Heterakis poculum n. sp.

Fig. 2.

aus dem Sandhuhn, *Francolinus adpersus* Waterh., im Darm.

Die Cuticula ist sehr fein queringelt und in den Seitenlinien zu Leisten erweitert, die vorn breit sind; das Kopfende hat einen flachen Mundbecher, die Mundöffnung ist von 6 Papillen umgeben. Der Oesophagus endigt mit einem Bulbus und nimmt beim Männchen $\frac{1}{5,3}$, beim Weibchen $\frac{1}{8,5}$ der ganzen Länge ein; der Nervenring steht dicht hinter dem Mundbecher, der Porus excretorius dicht vor dem Beginn des Oesophagus-Bulbus. Das 4,5 mm lange und 0,28 mm breite Männchen hat ein Schwanzende von $\frac{1}{29}$ der Gesamtlänge; die langen Spicula sind hinten fein zugespitzt und messen 0,79 mm; am Schwanzende stehen jederseits 10 Papillen, 2 prä-, 2 par- und 6 postanale; der von radiären Muskeln umgebene Saugnapf ist längsoval; der Hoden reicht vorn bis zum Beginn des Darmes.

Das Weibchen ist 8,5 mm lang und 0,43 mm breit; der kegelförmig zugespitzte Schwanz mißt $\frac{1}{9,7}$ der Gesamtlänge; die Vagina liegt vor der Mitte und teilt den Körper im Verhältnis von 20:33, die Geschlechtsorgane nehmen einen großen Raum ein, denn sie reichen vom Beginn des Darmes bis zum After; die Eier enthalten einen entwickelten Embryo und sind 0,065 mm lang und 0,049 mm breit.

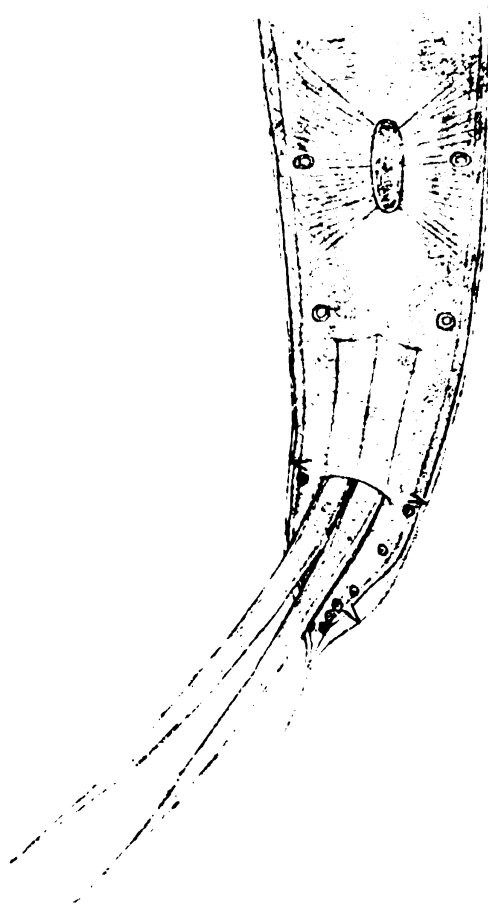


Fig. 2.
Männliches Schwanzende von *Heterakis poculum*.

Physaloptera brevicauda n. sp.

Fig. 3.

Aus dem Darm des Sandhuhnes, *Francolinus adpersus* Waterh.

Die Cuticula ist in Abständen von 0,010—0,0026 mm regelmäßig queringelt; am Kopfende stehen 2 nach außen verbreiterte Lippen mit schmaler Pulpa an der Wurzel; in der Mitte steht eine Papille, rechts und links davon ein kegelförmiger Zahn; der Oesophagus nimmt $\frac{1}{9}$ der Gesamtlänge ein; das Schwanzende ist bei beiden Geschlechtern sehr kurz.

Das Männchen, welches 27 mm lang und 0,83 mm breit ist, hat ein abgerundetes Schwanzende von $\frac{1}{69}$ Körperlänge mit einer längsgestreiften Bursa; die Längsstreifen bestehen aus länglich-runden Chitinplättchen; die Spicula sind 1,4 mm lang und am Ende abgerundet; am Schwanzende stehen jederseits 6 gestielte Papillen, 4 prä- und 2 postanale; die beiden letzteren stehen nebeneinander.

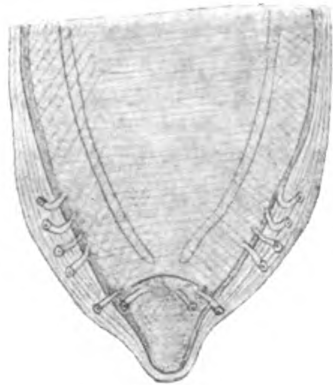


Fig. 3.
Männliches Schwanzende von
Physaloptera brevicauda.

Das Weibchen hat eine durchschnittliche Länge von 42 mm und eine Breite von 0,95 mm; der Schwanz ist im Gegensatz zu dem des Männchens kegelförmig verjüngt, am Ende spitz; die Vulva liegt dicht hinter der Körpermitte und teilt die Länge im Verhältnis von 23:21; die Eier sind klein und dick-schalig; ihre Länge beträgt 0,039 mm, ihre Breite 0,026 mm.

Oxyuris polyoon n. sp.

Fig. 4.

aus dem Darm des Erdmännchens, einem Eichhorn-ähnlichen Tier, *Xerus setosus* Forst.

Die Cuticula ist in Abständen von 0,0078 mm querverringelt; vorn ist sie an einer 0,12 mm langen Strecke stark verdickt, das Körperparenchym dagegen verdünnt; das abgerundete Kopfende trägt 3 Lippen; der Oesophagus ist dünn und endigt mit einem kugelförmigen Bulbus, der im Innern Ventalzähne trägt; die kleine hintere Hälfte ist braun pigmentiert; die Länge beträgt beim Männchen $\frac{1}{3,5}$, beim Weibchen $\frac{1}{4,6}$ der ganzen Tierlänge; das Ende des Oesophagus und des Bulbus sind durch einen kurzen, schmalen Hals getrennt; der Nervenring umgibt den Oesophagus 0,18 mm vom Kopfende, der Porus excretorius liegt ventral von dem Hals zwischen Oesophagus und seinem Bulbus.

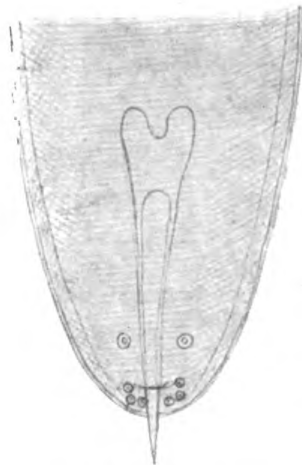


Fig. 4.
Männliches Schwanzende
von *Oxyuris polyoon*.

Das Männchen hat eine Länge von 3,26 mm und eine Breite von 0,33 mm; das Schwanzende ist $\frac{1}{74}$ der Gesamtlänge groß und nach der Bauchseite hin hakenförmig gekrümmt, mitunter auch in 2 Windungen eingerollt; die Samenblase ist sehr groß und nimmt etwa $\frac{1}{4}$ der Körperlänge ein, der Hoden reicht so weit nach vorn, daß er den Körper im Verhältnis von 11:8 von vorn nach hinten teilt; die

Spermatozoen sind platt, 0,016 mm lang und 0,010 mm breit; das Spiculum hat eine doppelte Wurzel und ist 0,23 mm lang; am Schwanzende stehen jederseits 4 prominente, kegelförmige Papillen, 1 prä-, 1 par- und 2 postanale.

Die Länge des Weibchens beträgt 5,28 mm, die Breite 0,35 mm, das lang- und fein-zugespitzte Schwanzende nimmt $\frac{1}{5,5}$ der ganzen Länge ein; die Vagina mündet weit vor der Körpermitte und teilt den Körper

von vorn nach hinten im Verhältnis von 19:41; sie verläuft nach hinten und die Ovarien reichen bis dicht an den Oesophagus-Bulbus; die Eier sind klein und ungemein zahlreich, sie sind 0,080 mm lang und 0,023 mm breit.

Oxyuris curvula Rud.

aus dem Darm von *Equus caballus*; von dieser Art lagen 2 Weibchen vor.

Stilesia hepatica Wolffh.

aus den Gallengängen der Leber von *Ovis aries* und *Capra hircus*. Wolffhügel beschrieb diese Art in der Berl. tierärztl. Wochenschr. 1903. No. 43. p. 1—16 nach in Deutsch-Ostafrika gefundenen Exemplaren; Scheben hat sie nun auch in Deutsch-Westafrika entdeckt.

Nachdruck verboten.

***Fasciolopsis Füllebornii* n. sp.**

[Aus dem Institut für Schiffs- und Tropenkrankheiten (Leiter: Medizinalrat Prof. Dr. Nöcht).]

Von Oberarzt Dr. Ernst Rodenwaldt.

Mit 1 Tafel und 3 Textfiguren.

Am 10. Februar 1909 kam im Seemannkrankenhaus zu Hamburg ein Inder, Abdulla Man, in Zugang, welcher mit der Wahrscheinlichkeitsdiagnose Typhus abdominalis ins Hospital geschickt worden war. Auf die Krankengeschichte wird weiterhin eingegangen werden.

Infolge des Befundes zahlreicher Helmintheneier, *Ascaris*, *Oxyuris*, *Ankylostomum* im Stuhl des Patienten wurde eine Thymolkur eingeleitet, welche unter zahlreichen anderen Helminthen 3 Exemplare eines neuen Trematoden zutage förderte. Von diesen Exemplaren wurden 2 schwach gepreßt, davon das eine mit Hämatoxylin gefärbt, daß 3. Exemplar, welches sich in leichtem Kontraktionszustand, ersichtlich an der Querrunzelung der Körperfläche, befand, wurde eingebettet und in eine Serie von Flachschnitten zerlegt. Weitere Exemplare zur Herstellung von Quer- und Längsschnittserien wurden leider auch bei Wiederholung der Kur nicht gefunden.

Die oberflächliche Durchsicht der Serie bestätigte sofort die schon an den ganzen Exemplaren gemachte Beobachtung, daß es sich bei den vorliegenden Trematoden nicht um den von Odhner¹⁾ beschriebenen *Fasciolopsis Buski* handeln könne, ja streng genommen nicht einmal um eine Species des Genus *Fasciolopsis*, falls man sich an die von Odhner gegebene Gattungsdiagnose halten will. Die gewaltige Entwicklung und charakteristische Schlängelung des Cirrusbeutels unterschied den Wurm auf den ersten Blick von dem *Fasciolopsis Buski*, als dessen nächster Verwandter wir ihn aber nach seinen übrigen Eigenschaften anzusprechen haben. Die Form des Cirrusbeutels zeigte andererseits eine gewisse Ähnlichkeit mit der von Poirier gegebenen Zeichnung²⁾ dieses Organs bei *Distoma Rathouisi*, so daß wir zu der von Odhner³⁾ neuerdings eingenommenen Stellung zu diesem Wurm einen neuen Gesichtspunkt gewonnen zu haben glauben.

1) Centralbl. f. Bakteriologie. Abt. I. Orig. Bd. XXXI. 1902. p. 573.

2) Reproduziert in Leuckart, Parasiten des Menschen. Leipzig 1901.

3) Odhner, Archives de Parasitologie. Vol. XII. 1909. No. 3. p. 467.

Es soll im folgenden eine Beschreibung des neuen Trematoden gegeben werden, wobei von einer Rekapitulation der Literatur aus mehreren Gründen Abstand genommen wird. Einerseits sind die Angaben in der älteren Literatur mehrerer Länder zerstreut und deshalb schwer zugänglich, andererseits kann kein Vorteil in der Heranziehung nur ungenau beschriebener, äußerlich ähnlicher Trematoden gesehen werden, angesichts der Tatsache, daß Würmer, die sich in ihrem äußeren Habitus so ähnlich sind wie *Fasciolopsis Buski* und unser Wurm, im Bau ihrer Organe so wesentliche Unterschiede aufweisen, und daß schließlich doch wahrscheinlich im *Distoma Rathouisi* ein dritter äußerlich ähnlicher, aber in seinem Bau von beiden verschiedener Wurm beschrieben worden ist. Es ist anzunehmen, daß die Zahl der Species von Darmtrematoden des Menschen weit größer ist, als die geringe Anzahl der bisher beschriebenen Fälle vermuten läßt, und daß daher möglicherweise die älteren Beobachter ganz verschiedene Species vor sich gehabt haben.

Die beigelegte Tafel ist aus einer Serie von 90 Flachschnitten kombiniert mittels Detailzeichnungen, die mit dem Abbeschen Zeichenapparat angefertigt wurden. Die Tafel ist demnach nur halbschematisch in bezug auf die Projektion der Organe in eine Ebene und entspricht in der relativen Lage der Organe und ihren relativen Maßen absolut der Wirklichkeit.

Zur Gattung *Fasciolopsis* (Looss) nach der von Odhner (l. c.) gegebenen Gattungsdiagnose gehört unser Wurm nach folgenden seiner Eigenschaften. Es handelt sich um eine Fascioline mit unbewaffneter Haut, einem sehr kräftig entwickelten, nach hinten sackförmig ausgestülpten Bauchsaugnapf, kleinem Mundsaugnapf, unverästeltem Darm, welcher die charakteristischen Wellungen und Biegungen dieser Gattung zeigt, mit annähernd in der Mitte des Körpers liegender Schalendrüse und nach rechts liegendem sehr kleinen Ovarium. Abweichend von der Gattungsdiagnose Odhners ist die gewundene Form des weit mächtigeren Cirrusbeutels und das Fehlen des Blindsacks der Samenblase.

Die 3 gefundenen Exemplare waren sehr verschieden groß, 5 : 1,4 cm, 4 : 1,5 cm, 3 : 1,6 cm. Das erste Exemplar (Abb. 1) erschien zungenförmig, in extremster Streckstellung, völlig frei von Runzelungen, das letzte fast eirund in extremster Kontraktion, denn auch in der Fixationsflüssigkeit fand keine weitere Zusammenziehung statt.

Die Bauchfläche ist flach, die Rückenfläche etwas gewölbt, beide ohne Bewehrung, die Seitenkanten ziemlich scharf. Wenn auch bei Betrachtung der ganzen Exemplare ein Kopfzacken nicht eben deutlich abgesetzt schien, ergaben doch die Schnitte das Vorhandensein eines deutlich abgesetzten fast runden Kopfteils, in dessen Bereich der vordere quere Verlauf der Darmschenkel, der Pharynx, Propharynx, Mundsaugnapf, der Genitalsinus und der vordere Teil des Bauchsaugnapfes zu liegen kommen. Falls es sich nicht um ein Kunstprodukt bei der Konservierung und Einbettung handelt, was jetzt mangels frischer Exemplare nicht mehr zu entscheiden ist, scheint nach dem Ausfall der Schnittserie dieser ganze Kopfteil etwas nach dorsal emporgebogen gehalten zu werden. Bauch und Rücken zeigten bei dem geschnittenen Exemplar die von Looss¹⁾ beschriebene feine Querrunzelung kontrahierter Exemplare, welche dem ersten zungenförmigen Exemplar völlig fehlte. Der Mundsaugnapf ist kreisrund; er ist — wieder den Serienschnitten nach —

1) Looss, Annals of Tropic. Medec. and Parasitol. Vol. I. 1907/8. p. 123.

schräg von ventral nach vorn gerichtet, er mißt im Durchmesser 0,75 mm, ist also größer als der Mundsaugnapf von *Fasciolopsis Buski*. Der Bauchsaugnapf zeigt im ganzen genau die von *Fasc. Buski* und *Dist. Rath.* beschriebene Form. Er mißt in seiner Apertur 2,6 mm (*Fasc. Buski* 1,6—2 mm) im Durchmesser, die Länge des ganzen Organs beträgt 2,9 mm, fast genau die Länge wie bei *Dist. Rath.* Die größere Länge der Breite gegenüber wird bedingt durch die sackförmige Ausbuchtung nach hinten, welche kugelförmig mit einer halsartigen Verengung mit dem vorderen offenen Teil in Verbindung steht. Aus den Querschnitten, bei denen die Tiefe des Organs leider nicht gemessen werden konnte, geht hervor, daß an der vorderen Wand des Bauchsaugnapfes eine breite Leiste — ähnlich einer *Columna rugarum* der *Vagina*

— in die Tiefe zieht, nach unten allmählich sich verschmälernd, und daß der Boden des Napfes nicht flach ist, wie bei *Fasc. Buski*, sondern sich trichterförmig in einem feinen Querspalt noch tief in die mächtige Muskulatur einsenkt. Auf die histologischen Details der Saugnapfe einzugehen, erübrigt sich im Hinblick auf die Beschreibung der bekannten Trematoden; die Verhältnisse liegen hier ganz genau wie bei *Fasc. Buski*.

Zwischen dem Mundsaugnapf und dem kugeligen Pharynx schiebt sich der von *Odhner* von *Fasc. Buski* beschriebene Präpharyngealsphinkter ein, ein von quer verlaufenden Muskel-

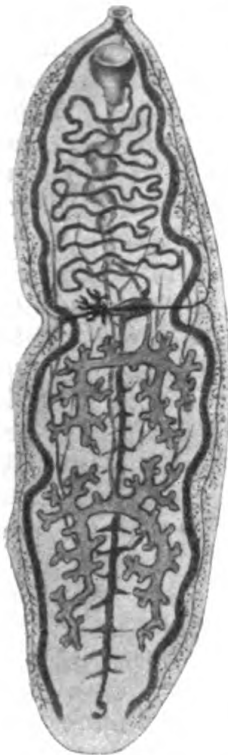


Fig. 1.

Fig. 1. Zungenförmiges Exemplar. Natürl. Größe 5:1,4 cm. Organbezeichnung siehe Tafel.

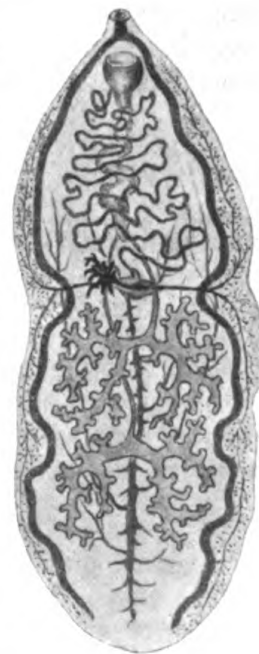


Fig. 2.

Fig. 2. Natürl. Größe 4:1,5 cm. Organbezeichnung siehe Tafel.

bündeln, stärkeren als der Mundsaugnapf, schwächeren als der Pharynx gebildetes Organ, welches den Präpharynx, soweit sich das aus den Flachschnitten beurteilen läßt, nur von unten und seitlich wie eine Hand umgreift und an Breite dem Mundsaugnapf gleichkommt. Der Pharynx selbst ist eine sehr kräftig entwickelte Muskelkugel von 0,7 mm Durchmesser, genau wie bei *Fasc. Buski*. Der Oesophagus fehlt fast ganz; fast unmittelbar hinter dem Pharynx, noch vor dem gemeinsamen Genitalsinus, gabelt sich der Darm in seine beiden Schenkel, welche zunächst quer verlaufen, um dann rechtwinkelig nach hinten abzubiegen. Die Darmschenkel sind zwar unverzweigt, wie man an dem großen zungenförmigen Exemplar sehen konnte, bilden aber bei geringer Kontraktion des Wurmes eine, auf ihrem ganzen Verlauf sehr regelmäßig verteilte Anzahl von zackigen Ausbuchtungen, welche besonders an den Biegungsstellen weitere Räume vortäuschen. Es scheint sich hierbei doch um die ersten Ansätze einer

feineren Verzweigung der Darmschenkel, wie bei *Fasc. hepatica* zu handeln. Genau wie bei *Fasc. Buski*, bilden die Darmschenkel beiderseits je eine tiefe Einbuchtung in der Höhe der Schalendrüse, eine zweite zwischen beiden Hoden, verlaufen aber auch im übrigen nicht völlig gerade. Besonders in der vorderen Körperhälfte erscheinen sie stärker gewellt, bei dem kontrahierten Exemplar fast zurückgebogen, eine Einbuchtung hinter dem hinteren Hoden ist konstant. Sie ziehen von etwas dorsaler Lage im Vorderkörper, im Hinterkörper mehr nach ventral und endigen natürlich blind, ohne im Verlauf ihr Kaliber zu ändern. Der Darm besitzt eine dünne, innere Längs-, eine starke mittlere Rings- und eine mittelstarke äußere Längsmuskulatur.

Das Exkretionssystem zeigt eine äußerst interessante Differenzierung. Dorsal von den Hoden zieht ein breites, flaches Hauptgefäß vom Hinterende nach vorn bis unmittelbar vor den hinteren Hoden. Auf diesem Wege gibt es in sehr regelmäßigen Abständen Queräste ab, so daß hinter dem hinteren Hoden im freien Teil des Mittelfeldes das Bild eines mehrfachen Jakobsstabes entsteht. Der erste im Bereich der Hoden abgehende Querast, der stärker an Kaliber als die übrigen ist, biegt nach anfänglich quерem Verlauf ziemlich rechtwinklig nach vorn um und versorgt auf diese Weise die Seitenäste des hinteren Hodens. Weiterhin passen sich die quer abgehenden Aeste natürlich dem Verlauf der Schlingen des hinteren Hodens an, zwischen denen hindurch sich windend sie den Seitenfeldern zustreben. Bald nach vorn vom hinteren Hoden geht jederseits, aber nicht symmetrisch entspringend, ein starkes Hauptgefäß schräg nach vorn, erreicht durch die Aeste des vorderen Hodens hindurch die erste quere Darmeinbuchtung, welche es in der Mitte dorsal überschreitet. Die weitere feinere Verzweigung paßt sich absolut dem durch die Lage der übrigen Körperorgane gelassenen disponiblen Raum an, speziell die Hodenschlingen sind allseitig von einem Netz feiner Kanäle umspinnen. Zurück zum Hauptgefäß. Dieses zieht nach Abgabe der beiden Hauptäste mit nur geringer Kaliberänderung, aber etwas gewunden, weiter nach vorn und gibt auf diesem Wege nur kurze quere Aeste ab. Am Hinterrande der Schalendrüse angelangt, spaltet es sich in 2 ungleiche Aeste, von denen der rechte schwächere ausschließlich das Ovarium zu versorgen scheint, während der linke, stärkere die linke Hälfte der Schalendrüse mit einer Biegung nach links dorsal überschreitet und, zwischen den ersten Uterusschlingen quere Aeste abgebend, schräg zum Hinterende des Cirrusbeutels hinzieht. Hier scheint das Exkretionssystem einen weiten Sinus zu bilden, welcher, indem er die den Cirrusbeutel umgebenden Gewebe auflockert, diesem muskulösen Organ die nötige Freiheit zu peristaltischer Aktion schafft. Von diesem Sinus führen wiederum quere Aeste seitlich zu dem Uterus hin. Die Seitenfelder des Vorderkörpers mit den Dotterstöcken werden durch die obengenannten beiden Hauptäste versorgt. Die Oeffnung des Exkretionssystems liegt am Hinterende und mündet dorsal aus; eine wesentliche Muskelentwicklung in ihrer Umgebung ist nicht zu sehen.

Das große Hauptgefäßsystem ist nur von einer zarten Lage von Längsmuskulatur begleitet, von welcher an den Abgangsstellen größerer Seitenäste einige Fasern sich zu queren Schlingen abspalten. Der Inhalt besteht aus einer deutlich körnigen Masse.

Während also in der Anlage eines fast die ganze Länge des Wurmes durchziehenden Längsstammes eine gewisse Verwandtschaft mit dem

Exkretionssystem der *Fasc. hepat.* besteht, bietet die Ausbildung der ziemlich früh entspringenden schrägen Hauptäste eine Analogie zu einfacher organisierten Trematoden.

Die Hoden entsprechen im wesentlichen den für *Fasc. Buski* beschriebenen Verhältnissen. Der Wurm besitzt zwei genau hintereinander liegend angeordnete Hoden, welche sich reich, meist dichotomisch verzweigen und die gesamte Fläche des Mittelfeldes im hinteren Körperende einnehmen, mit Ausnahme — wie bei *Fasc. Buski* — der hinteren 3–4 mm, in welchen, wie oben gesagt, der vom Exkretionssystem gebildete Jakobsstab sichtbar wird.

Die beiden Hoden sind durch die erwähnte Einbuchtung der Darmschenkel sehr deutlich voneinander geschieden, und zwar derart, daß dem vorderen ein mehr querovales, etwas kleineres Feld zur Verfügung steht, in welchem er sich außerordentlich symmetrisch unter dichotomischer Spaltung der Hauptäste ausbreitet. Dem hinteren Hoden steht zu seiner Ausbreitung ein größeres Feld von der Form eines Trapezes mit nach vorn gerichteter Basis zur Verfügung; er verzweigt sich infolgedessen nicht absolut symmetrisch, sondern sendet die beiden hinteren, aus der ersten dichotomischen Teilung hervorgehenden Äste weit nach kaudal zurück. Ob dieses Verhältnis der beiden Hoden zueinander, wie es bei den 3 vorhandenen Exemplaren beobachtet wurde, absolut immer die Regel ist, muß fraglich erscheinen; Odhner hat bei *Fasc. Buski* Variationen in der Größe beobachtet; in dem von ihm abgebildeten Exemplar ist zufällig der hintere Hoden der kleinere.

Von den Vasa deferentia zieht dasjenige des vorderen Hodens auf der linken Seite der Schalendrüse sehr nahe an ihr vorbei zum Cirrusbeutel, indem es auf seinem Wege mehrfache erhebliche Windungen bildet. Viel gerader gestreckt zieht das Vas deferens des hinteren Hodens dorsal über vorderen Hoden und Ovarium hinweg rechterseits von der Schalendrüse zum Cirrusbeutel. Beide besitzen nur eine einfache Längsmuskulatur, während die Hodenschlingen von einer doppelten Lage sich überkreuzender Muskelschichten überdeckt sind, von denen die äußere quer zur Gangrichtung verläuft.

An Größe und Masse seines Cirrusbeutels ist dieser Wurm allen bekannten Trematoden überlegen. Schon bei Betrachtung eines unaufgehellten, ungepreßten Exemplars im durchfallenden Licht hebt sich das mächtige Organ aus dem Körper deutlich heraus; es ist im Vorderteil des Wurms leicht fühlbar. Mit ihm zeigt unser Wurm den wichtigsten Unterschied von *Fasc. Buski*. Dort ein zylindrischer, in allen Abschnitten gleich dicker Cirrusbeutel von 0,25–0,33 mm Dickendurchmesser, hier ein in zwei typische Windungen gelegtes, im Mittel 1 mm dickes Organ, welches besonders an seinen Windungsstellen recht erhebliche Kaliberänderungen zeigt. Während das Hinterende des Cirrusbeutels von *Fasc. Buski* genau in der Mitte zwischen dem Hinterrand des Bauchsaugnapfes und der Schalendrüse liegt, betrug an unserem geschnittenen Exemplar die Entfernung vom hinteren Ende des Bauchsaugnapfes bis zur Einmündungsstelle der Vasa deferentia 5,4 mm, von dort bis zur Schalendrüse 2 mm; bei den gepreßten und bei völlig gestreckten Exemplaren ändert sich das Verhältnis noch mehr zuungunsten der letzteren Differenz.

Die Vasa deferentia münden zunächst in einen kleinen, kugeligen Appendix des Cirrusbeutels mit ebensolchem Hohlraum. Aus diesem führt ein verhältnismäßig enger Kanal in den Anfangsteil des eigent-

lichen Cirrusbeutels, in welchem dieser Kanal demnächst eine Schleife bildet, um dann in die taschen- und winkelreiche Samenblase einzumünden. Die Samenblase zeigt in den meisten Querschnitten ein unregelmäßiges, sternförmiges Lumen, welches durch Hervortreten starker, balkenartiger Wülste der Wandung entsteht. Dieses geringe, virtuelle Lumen erweitert sich, und zwar gerade vor den Stellen starker Umbiegung zu großen, sackförmigen Höhlungen, von denen wieder kleine, flache Blindsäcke sich in die Wandung hineinerstrecken. Im ganzen kann man deutlich 3 solcher größeren Ausbuchtungen der Samenblase beobachten, die erste am Ende des langen wurstförmigen Teils des Cirrusbeutels, die zweite kurz vor der äußersten Stelle der ersten nach rechts gehenden Windung, die dritte auf der linken Seite vor der Umbiegung zur zweiten kleineren Windung, die wiederum nach rechts geht. Diese zweite Windung des Cirrusbeutels bietet wieder nur ein virtuelles Lumen mit sternförmigem Querschnitt, welches sich in den geraden, unter dem Bauchsaugnapf liegenden Teil fortsetzt, sich dort zu dem eigentlichen Cirrus erweitert, um dann vor der Mündung wieder eng zu werden. Die Ausbildung einer Pars prostatica war nicht zu sehen, ebensowenig eine innere Bewehrung an der Wand des Cirrus.

Der Cirrusbeutel trägt an der Außenseite eine dünne, aber aus starken Fasern bestehende Längsmuskulatur, davon nach innen eine die Hauptmasse seiner Wand bildende starkschichtige Ringmuskulatur, auf welche nach innen ein lockeres, maschiges Fasergewebe folgt, aus dem die offenbar weichen und faltbaren Balken und Wände der Samenblase gebildet sind und welches nach innen von einer dünnen Schicht Ringmuskulatur überzogen ist. Zwischen der starken Ringmuskulatur der Wand ziehen zarte Muskelbündel radiär, die sich in dem lockeren Fasergewebe aufsplintern.

Die beschriebene und abgebildete Windungsform des Cirrusbeutels ist keinesfalls eine Folge der Kontraktion des in Serienschnitte verarbeiteten Wurmes, sie ist in der gleichen Vollkommenheit und in der typischen Anordnung auch bei dem völlig gestreckten zungenförmigen Exemplar sichtbar. Die ursprüngliche Bestimmtheit dieser Form scheint sich auch in der Kaliberänderung an den Umbiegungsstellen zu dokumentieren und die Samenblase mit ihren Hohlräumen dieser typischen Windungsform angepaßt zu sein. Vor allem ist die relative Länge des Cirrusbeutels auch in dieser gewundenen Form, mit der er schon $\frac{2}{3}$ der Entfernung vom Bauchsaugnapf bis zur Schalendrüse einnimmt, eine so große, daß er in seiner absoluten Länge ausgestreckt, in keiner Weise im Körper des Wurmes untergebracht werden könnte. Auch deutet die Anordnung der Muskulatur und die Form des Lumens der Samenblase auf ein konstantes Innehalten der abgebildeten Form hin, in welcher wahrscheinlich nur durch peristaltische Bewegungen geringe Aenderungen eintreten. Ein Blindsack, wie bei *Fasc. Buski* fand sich nicht.

Vergleicht man die von Poirier gegebene Abbildung (Fig. 3) (wiedergegeben in Leuckart, Die Parasiten des Menschen, Leipzig 1901) des Cirrusbeutels von *Dist. Rath.* mit dem Cirrusbeutel unseres Wurmes, so fällt die Aehnlichkeit der gewundenen Form sehr stark in die Augen, obwohl hier nur eine Windung vorhanden ist. Auch die Kaliberänderung des abgebildeten Cirrusbeutels scheint mir dafür zu sprechen, daß hier eine bestimmte Bildung vorliegt, die nicht durch Zusammenfaltung eines zylindrischen Rohres bei der Kontraktion des

Wurmes entstanden ist, ganz abgesehen davon, daß schwer vorstellbar ist, wie ein so muskelkräftiges Organ durch die einfache Kontraktion des Wurmes so leicht zusammengebogen werden sollte, anstatt wie ein federnder Stab die Kontraktion zu verhindern. Auch die absolute Breite des Cirrusbeutels bei Dist. Rath., wenn man auf der genannten Abbildung den Cirrusbeutel mit dem Bauchsaugnapf vergleicht, zeigt eine Analogie mit unserem Wurm. Aus diesen Gründen kann man der Ansicht Odhners, man müsse das Dist. Rath. als selbständige Art fallen lassen, nicht ohne weiteres beistimmen, muß vielmehr annehmen, daß wir in ihm einen nahen Verwandten unseres Wurmes vor uns haben, einen näheren als Fasc. Buski.

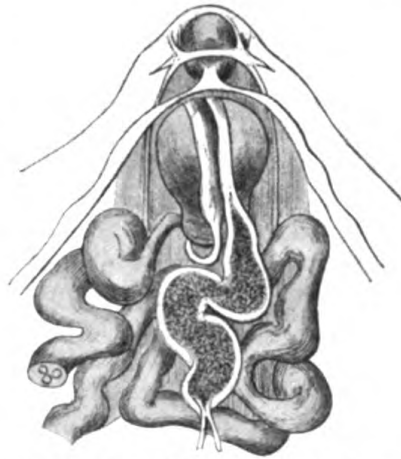


Fig. 3. Kopfteile von Distoma Rathouisi (dorsal gesehen). Geschlängelter Cirrusbeutel. Nach Leuckart.

Die weiblichen Geschlechtsorgane werden gebildet durch Eierstock, Dotterstöcke, Schalendrüse, Uterus und Vagina.

Das Ovarium ist wie bei Fasc. Buski sehr klein, liegt in der rechten Körperseite, sehr stark ventral und hat die Gestalt einer stark verzweigten Hirschstange. Die Mehrzahl der Sprossen richtet sich nach vorn und seitlich, nur ein größerer Ast führt nach hinten. Die Drüse mündet mit einem breiten, sich rasch verengenden Ausführungsgang in die Schalendrüse ein. Derselbe durchzieht die mandelförmige Schalendrüse in querer Richtung von rechts nach links auf der ventralen Seite. Dorsal über ihm und mit ihm in Kommunikation liegt in der Mitte der Drüse das kugelige Dotterreservoir, in welches von seitlich und etwas von hinten her die Ausführungsgänge der Dotterstöcke ziemlich hoch dorsal einmünden. Noch bevor der Ausführungsgang des Ovariums das Niveau des Dotterreservoirs erreicht, also noch in der rechten Hälfte der Schalendrüse, entsendet er nach dorsal den Laurerschen Kanal, welcher solange wie möglich in der Substanz der Schalendrüse nach dorsal zieht und bis zu seiner Mündung auf der Rückenfläche des Tieres korkzieherartige Windungen beschreibt. Auf der linken Seite der Schalendrüse verläßt der Ausführungsgang dieselbe wieder und bildet unmittelbar hinter seinem Austritt einen kugeligen Anhang. In dem Inhalt dieses kugeligen Sackes haben sich Spermatozoen nicht nachweisen lassen, also auch nicht entscheiden lassen, ob es sich hier etwa um ein Receptaculum seminis handelt.

Von hier ab beginnen die Uterusschlingen, welche in einer großen Anzahl von Querschleifen, wahrscheinlich sehr variabel, das gesamte Mittelfeld von rechts nach links überziehen und dabei viele Schwindungen nach dorsal und ventral ausführen. Wo sie aber den Cirrusbeutel überqueren, tun sie es regelmäßig ventral und scheinbar gerade an den Stellen, an denen das Lumen der Samenblase eng ist, das Kaliber des Cirrusbeutels eine Verminderung aufweist. Ein Unterschied von Fasc. Buski besteht hier insofern, als die Anzahl der Windungen, wenn man die Zeichnung von Odhner zugrunde legt, eine weit größere ist, daß Blindsäcke nicht vorgetäuscht werden, daß vor allem die Mehrzahl der Querschlingen sich im Bereich des Cirrusbeutels herüber-

spannen und daß beiderseits zwei stark gewundene Schlingen sich neben dem Bauchsaugnapf nach vorn drängen.

Wie bei *Fasciolopsis Buski* geht am Hinterende des Bauchsaugnapfes der Uterus in die Vagina über, welche in flacher Windung links vom Cirrusbeutel dorsal vom Bauchsaugnapf nach vorn zieht. Sie hat eine aus zarten Fasern bestehende Ringmuskulatur und ein breites, an den Enden sternförmig auslaufendes Lumen, welches bei unserem Exemplar virtuell war, wahrscheinlich aber der Entfaltung zu einem weiten Hohlraum fähig ist. Ihre Mündung ist wenig differenziert, spaltförmig, etwas ausgezackt und umschließt die Mündung der männlichen Geschlechtsorgane links seitlich und nach vorn. Beide liegen in einer flachen Einsenkung des Kopfteils, einem Sinus, der irgendwelche Differenzierung muskulöser Art nicht zeigt.

Die Eier messen durchschnittlich ziemlich genau 0,1 mm in der Länge, 0,73 in der Breite, sind also etwas kleiner als die Eier von *Fasc. hepatica* und *Fasc. Buski*. Sie enthalten große Körner von Dottermaterial, welches nach außen von einer breiten, hellen Zone umgeben ist. Die Schale erscheint zwar doppelt konturiert, ist aber sehr dünn, so daß die Eier deshalb und wegen der breiten hellen Zone im Stuhl als sehr große Ankylostomeneier erscheinen können. Die von Looss für *Fasc. Buski* abgebildete mehr spitz-ovale Form zeigen sie nicht, sie sind völlig oval, ihr Deckel ist sehr klein und an den im Uterus liegenden Exemplaren nur sehr schwer sichtbar.

Die Schalendrüse ist breit, queroval, nach links spitzer auslaufend. Ihre Form kann am besten mit der einer Mandel verglichen werden. Sie ist 2,3 mm breit, 1,2 mm lang, besteht aus einem dichten Gefüge von Drüsenzellen. Bei *Fasc. Buski* ist sie viel kleiner, 1—1,5 mm im Durchmesser und rund.

Die Dotterstöcke ähneln durchaus den von *Fasc. Buski* beschriebenen, ihre Follikel sind außerordentlich klein, eng stehend, stoßen am Hinterende des Tieres fast zusammen, bilden von den Sammelröhren aus, welche sich fast genau in Niveauhöhe des Darmes halten, eine dorsale und ventrale Schicht, welche wohl auch dorsal und ventral den Darm nach medial etwas überragt. Die Sammelröhren halten sich in den Seitenfeldern dem Darm näher als dem Seitenrand des Tieres, vordere und hintere vereinigen sich in Höhe der ersten Einbuchtung des Darms zur Schalendrüse hin, ihr gemeinsamer Ausführungsgang überschreitet den Darm ventral genau an der engsten Stelle seiner Einbuchtung und mündet in gerader Richtung ohne Windung in das in der Schalendrüse liegende Dotterreservoir, der rechte liegt auf diesem Wege dorsal vom Ovarium.

Legen wir bei der Einordnung unseres Wurmes in das System die von Odhner (l. c.) für das Genus *Fasciolopsis* (Looss) gegebene Gattungsdiagnose zugrunde, so gehört unser Wurm einer neuen Gattung an.

Die Odhnersche Diagnose lautet: Fasciolinen mit ohne als Kopfzacken vom übrigen Körper abgesetztem Vorderkörper. Die Haut völlig unbewaffnet, Bauchsaugnapf sehr kräftig entwickelt, nach hinten sackförmig ausgestülpt und viel größer als der Mundsaugnapf. Darmschenkel ohne Verästelungen. Hoden fingerförmig verzweigt, mit nach ihren blinden Enden zu allmählich sich verzüngenden Aesten. Cirrusbeutel sehr lang, zylindrisch, in seiner größten Länge von einer gewundenen schlauchförmigen Samenblase eingenommen, die mit einem eigentümlichen Blind-

sack in Verbindung steht. Cirrus mit feinen Stacheln dicht besetzt. Im Darmkanal von Säugern. Typus: *Fasc. buski* (Lank.).

Wie ersichtlich, handelt es sich hier um eine sehr detaillierte Diagnose, die für weitere Species keinen großen Spielraum läßt, die auf unseren Wurm jedenfalls nicht anwendbar ist.

Wenden wir uns zu der ursprünglichen Gattungsdiagnose von Looss (Zoologische Jahrbücher. Bd. XII. 1899. p. 557) Gattung *Fasciolopsis* n. g.: Körper breit und abgerundet ohne deutlich abgesetzten Kopfzacken. Darmschenkel verästelt oder einfach (?). Haut bestachelt oder glatt (?). Im übrigen wie *Fasciola*.

Diese viel weiter gefaßte Diagnose läßt größeren Spielraum, trifft aber auf unseren Wurm ebenfalls nicht zu. Nachdem aber Looss (Annals of trop. med. l. c.) *Fasciolopsis Buski*, so wie es Odhner beschrieben hat, als zu der von ihm aufgestellten Gattung gehörig akzeptiert hat, darf man annehmen, daß er einige der von ihm aufgestellten Gattungsmerkmale fallen gelassen hat.

Es kommt hinzu, daß von C. M. Heanley (Journ. of trop. Med. and Hyg. Vol. XI. 1908. No. 8) neuerdings ein neuer menschlicher Trematode beschrieben worden ist, welcher nach der allerdings sehr unvollkommenen Abbildung mit *Fasciolopsis Buski* und unserem Wurm die Lage der Hoden hintereinander, die relative Lage von Ovarium und Schalendrüse, mit unserem Wurm die Form des Cirrusbeutels gemeinsam hat, während ihm dagegen ein Bauchsaugnapf, wie diesen beiden Würmern, fehlt und er dafür einen deutlich abgesetzten Kopfzacken besitzt.

Sollte also nicht die Form der Hoden und ihre Lage im Mittelfeld, die schlichte, unverzweigte Form der Darmschenkel, die unarmierte Cuticula, die relative Größe des Cirrusbeutels, die Form und Lage des Ovariums für die Gattungsdiagnose *Fasciolopsis* genügen? In diesem Genus hätten wir alsdann vorläufig 3 sichere Species anzuführen: 1) *Fasciolopsis Buski*, 2) den von Heanley beschriebenen Wurm, 3) unseren Wurm und als eine ungewisse Species das sogenannte *Distoma Rathouisi*.

Die Gattungsdiagnose würde hiernach lauten: Große Fasciolinen mit glatter, unbewehrter Haut und von zungenförmiger Gestalt. Große, fingerförmig verzweigte Hoden im Mittelfeld hintereinanderliegend. Darmschenkel unverzweigt. Ovarium klein, fein verästelt, liegt mit der Schalendrüse etwa in der Körpermitte. Relativ großer Cirrusbeutel.

Species: *Fasciolopsis Buski* (Lank.),

Fasciolopsis n. sp. (Heanley),

Fasciolopsis Füllebornii (mihi),

und *Fasciolopsis* (*Distoma*) *Rathouisi* (Poirier).

In keiner Weise läßt sich entscheiden, ob die von älteren Untersuchern gefundenen Trematoden, vor allem die von Busk gesehenen mit dem von Odhner oder dem von uns beschriebenen Wurm identisch sind. Praktisch läßt sich nur so verfahren, daß der von Odhner beschriebene Wurm den in die Literatur eingeführten Namen *Fasciolopsis Buski* behält, mit dem Recht, daß Busk als erster einen Trematoden der Gattung *Fasciolopsis* beim Menschen gesehen hat.

Für den neuen Wurm schlage ich, eine Pflicht der Dankbarkeit gegen meinen Lehrer erfüllend, den Namen *Fasciolopsis Füllebornii* n. sp. vor.

Betreffs der klinischen Bedeutung des Wurmes sei kurz auf die Krankengeschichte eingegangen.

Der Inder Abdulla Man aus Kalkutta, Trimmer, kam in das Seemannskrankenhaus mit der Wahrscheinlichkeitsdiagnose Unterleibstypus. Er sollte seit 14 Tagen an Fieber gelitten und Durchfälle gehabt haben, zuletzt soll etwas Husten, aber keine Schmerzen vorhanden gewesen sein.

Der Befund ergab von Symptomen des Typhus eine typische Typhuszunge, Gespanntsein der Bauchdecken, weichen, breiigen Stuhl. Dagegen war die Milz nicht palpabel, Störung des Sensoriums und Kopfschmerzen fehlten. Alle anderen Organe waren frei von krankhaften Erscheinungen. Die Temperatur stieg am 1. Tage bis 39,6°, sank am nächsten Tage unter tiefer Intermission, die von Erbrechen begleitet war, zur Norm, um in den nächsten Tagen wieder abendliche Erhebungen bis 38° anzuzeigen. Vom 2. Tage der Thymolkur, an welchem 3 Exemplare des beschriebenen Trematoden entleert wurden, sank die Temperatur zur Norm und blieb so.

Widalsche Reaktion war negativ ausgefallen. Die Stühle waren aber erbsenbreiartig und zeigten blutige Streifen.

Mittels Anreicherungs-methode des Stuhles auf Helmintheneier wurden im Stuhle nachgewiesen die Eier von *Trichocephalus trichiuris*, *Oxyuris vermicularis*, *Ascaris lumbricoides*, *Ankylostomum duodenale* und ein größeres Ei, welches mit dem des *Ankylostomum* Aehnlichkeit zeigte.

Am 2. Tage entleerte der Patient durch Erbrechen ein Männchen von *Ascaris lumbricoides*.

Die auf die Diagnose Helminthiasis hin eingeleitete Thymolkur (1. Tag 2 g, 2. Tag 3 g, 3. Tag 4 g, auf nüchternem Magen) förderte am 1. Tage zahlreiche Oxyuren, am 2. Tage die 3 Trematoden und während der ganzen Kur und den folgenden Tagen im ganzen 3 Exemplare von *Ascaris lumbricoides* und einige Exemplare *Necator americanus* zutage.

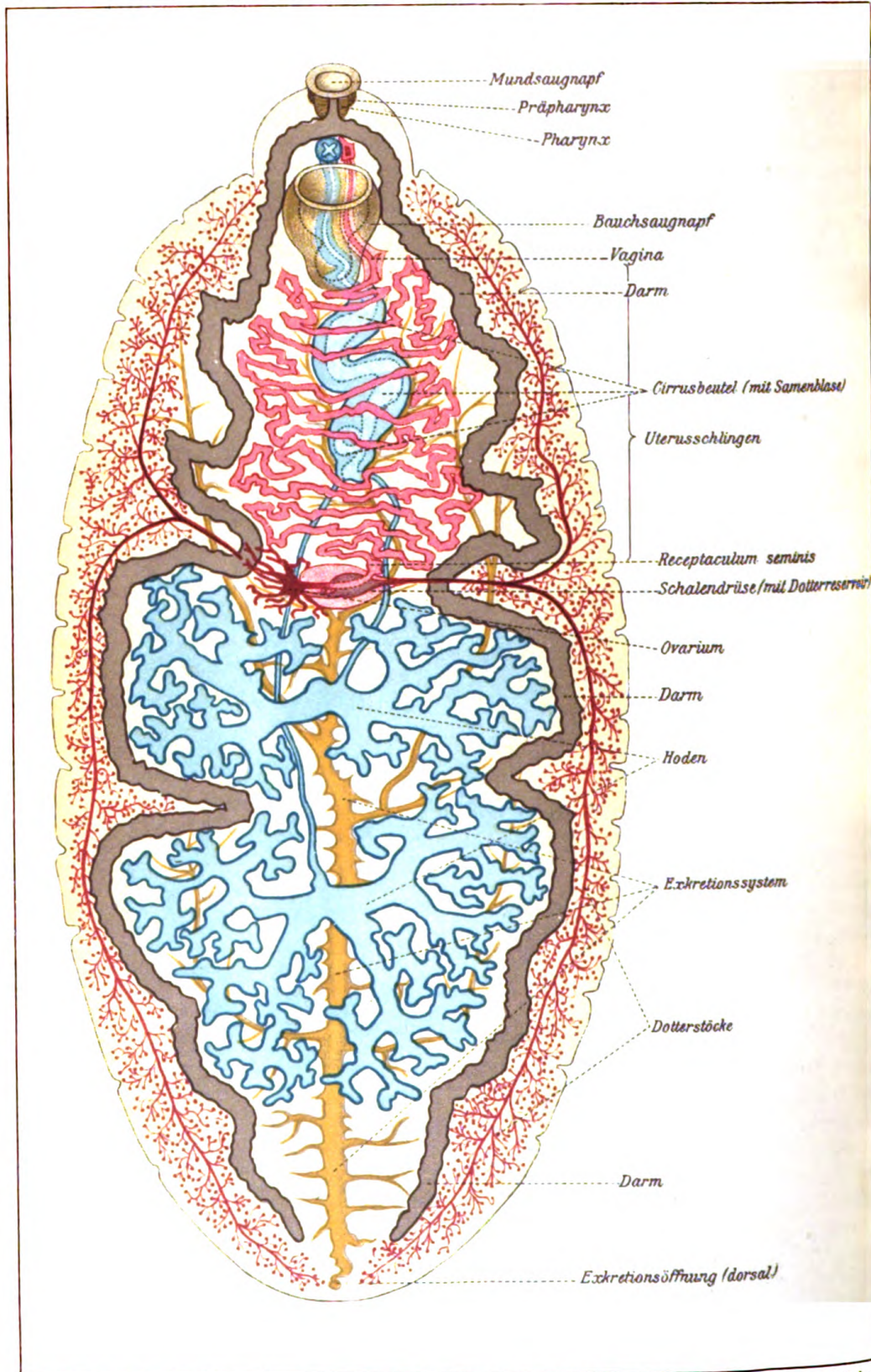
Vom Tage nach der Thymolkur an besserte sich das Befinden des Patienten sichtlich, die Rekonvaleszenz war ungestört, eine zweite Thymolkur nach 8 Tagen war resultatlos, der Patient verließ nach Verlauf von 3½ Woche das Krankenhaus mit einer Gewichtszunahme von 4 kg.

Wir können uns nicht zu der Ansicht bekennen, daß die geschilderten Krankheitserscheinungen etwa auf das Vorhandensein von *Ascaris* und *Necator* zurückzuführen sei, dazu war die Zahl dieser Helminthen viel zu gering.

In Uebereinstimmung mit den über klinische Erscheinungen bei *Fasciolopsis Buski* in der Literatur gegebenen Daten ist anzunehmen, daß das typhusähnliche Krankheitsbild auf die Einwirkung der Trematoden zurückzuführen ist.

Es erhellt aus diesem Krankheitsfall die unendliche Wichtigkeit der genauen Stuhluntersuchung auf Helmintheneier. Wir verfehlen nicht, bei dieser Gelegenheit auf die ausgezeichnete Methode der Eieranreicherung im Stuhl von Telemann (Deutsche med. Wochenschr. 1908. No. 35) hinzuweisen, welche uns in diesem Falle rasch zum Ziele führte und uns im übrigen bei Untersuchung der Stühle, besonders Farbigere, viele Arbeit gespart, und doch weit häufiger als früher positive Resultate ergeben hat.

Methode: Erbsengroße Stuhlteilchen aus verschiedenen Teilen des Stuhles werden ins Reagenzglas in ein Gemisch von Aether und reiner Salzsäure 1:1 gebracht, nach Umschütteln wird die Mischung durch ein Haarsieb gegossen, die Lösung alsdann zentrifugiert. In der untersten



Rodenwaldt u Wangerin gez.

Verlag von Gustav Fischer in Jena.

Lith. Anst. v. Johannes Arndt, Jena

Schicht des Zentrifugats liegen die Helmintheneier, welche zwar zum Teil in ihrer Form etwas verändert sind, *Ascaris* verliert z. B. regelmäßig seine Schleimschicht, bei *Ankylostomum* quellen die Zellen der Furchungskugel, aber doch eine rasche und sichere Diagnose gestatten.

Die Differentialdiagnose zwischen Typhus abdominalis und einem auf Trematoden zu beziehenden Krankheitsbild ist entscheidend für zwei durchaus entgegengesetzte Formen der Therapie. Bei einem Typhus mit blutig tingierten Stühlen sorgfältige Stillstellung des Darmes, hier eine relativ gewaltsame Entleerung des Darmes.

Unter diesem Gesichtspunkt haben wir die Beschreibung des neuen Trematoden vom Standpunkt der tropenmedizinischen Praxis für der Mühe und Erwähnung wert gehalten.

Tafelerklärung.

Ansicht des Wurmes von der Ventralfläche.

Blau: Das männliche Genitalsystem: Hoden, Vasa deferentia, Cirrusbeutel.

Rot: Das weibliche Genitalsystem: Ovarium, Dotterstöcke, Schalendrüse, Laurer-scher Kanal, Receptaculum seminis, Uterus, Vagina.

Braun: Saugnäpfe und Digestionstraktus: Präpharynx, Pharynx, Darmschenkel.

Gelb: Exkretionssystem.

Nachdruck verboten.

Das Vorkommen von *Ascaris mystax* beim Löwen.

[Pathologisches Institut der tierärztlichen Hochschule zu Mailand
(Direktor Prof. Dr. G. Guerrini).]

Von Dr. Giovanni Vallillo, Assistenten.

Kürzlich habe ich Gelegenheit gehabt, eine aus einem wandernden Zwinger stammende Leiche eines 6-jährigen Löwen zu sezieren. Indem ich über die pathologisch-anatomischen Veränderungen, die keine Beziehung mit dem Argument der vorliegenden Mitteilung haben, flüchtig hinweggehe, beschränke ich mich hier darauf, die wenigen Beobachtungen über den Verdauungskanal aus dem Sektionsprotokoll wiederzugeben:

„Die Magenschleimhaut sowie die Schleimhaut des Dün- und Dickdarmes ist gerötet, geschwollen und in ihrer ganzen Ausdehnung mit einer sehr dicken Schleimschicht bedeckt, worin eine große Anzahl von Helminthen vorhanden ist. Keiner von diesen haftet an der Schleimhaut, alle haben eine ziemlich gleichmäßige Zylinderform und eine weißliche Farbe und viele sind an einem Ende spiralig aufgerollt. — Der Parasiten sind im ganzen etwa zweihundert.“

Eine spätere sorgfältige Betrachtung lieferte mir sichere Daten, um den Platz festzustellen, den man den betreffenden Nematoden in der Klassifizierung der Parasiten zuweisen soll.

Vor allem ließen sich bei dieser Betrachtung 2 Sorten von Exemplaren unterscheiden: Die einen 20—25 mm lang, die anderen 45—55 mm lang. Bei den beiden Sorten konnte man mit Hilfe einer Linse sehen, daß ein Körperende mit 2 seitlichen flügelartigen Ausbreitungen versehen war, so daß es nach Art einer Lanzenspitze gemacht schien.

Bei der mikroskopischen Untersuchung erwies es sich, daß das oben erwähnte Ende dem Kopfteil entsprach und 3 Lippen mit glattem

Rande besaß. An dem entgegengesetzten spiralig aufgerollten Teil der kleinen Exemplare (Schwanzende) bemerkte man zwei etwas gekrümmte Stäbe (Spicula), von denen der eine kürzer als der andere war. Bei den großen Exemplaren sah man am Ende des ersten Körperviertels die weibliche Geschlechtsöffnung.

Diesen Kennzeichen zufolge kann man schließen, daß die oben beschriebenen Nematoden nichts anderes als *Ascaris mystax* waren, und daß die kleinen Exemplare die Männchen und die großen die Weibchen darstellten.

Es ist bekannt, daß *Ascaris mystax* ein Parasit ist, der sehr häufig im Dünndarm der Hauskatze (Varietät *felis*) und oft auch im Dünndarm des Hundes (Varietät *canis*) vorkommt. Der *Ascaris* der Katze aber hat größere Dimensionen: das Männchen von 40—60 mm; das Weibchen von 60—100 mm (Railliet¹). Die Varietät *canis* des *Ascaris mystax* ist noch größer als die der Katze, da das Männchen von 50—90 mm und das Weibchen von 90—120 mm mißt (Railliet¹).

Also ist der von mir im Magen und Darm des Löwen gefundene *Ascaris* eine andere Varietät von *Ascaris mystax*, kleiner als die des Hundes und der Katze.

In der Literatur kenne ich nur einen Fall von *Ascaris mystax* beim Löwen²). Derselbe wurde von Linton mitgeteilt. Dieser Beobachter fand im Dünndarm eines jungen Löwen kleine Nematoden, die er von Professor Shipley in Cambridge untersuchen ließ. Shipley betrachtete die kleinen Würmer als eine kleine Varietät von *Ascaris mystax*. Leider beschreibt Linton aber weder die Kennzeichen, noch gibt er die Maße der Parasiten an.

Nichdestoweniger dient der berichtete Fall zur Begründung meiner Beobachtungen, daß beim Löwen eine kleine Varietät des *Ascaris mystax* vorkommt (Varietät *leonis*).

Nachdruck verboten.

De l'influence de l'opothérapie thyroïdienne et du traitement iodé sur le pouvoir hémolytique du sérum.

[Institut bactériologique de l'Université de Liège, Prof. Malvoz.]

Par **Leon Muller.**

Avec 3 diagrammes.

Le corps thyroïde — ainsi que de nombreux essais l'ont établi — n'est pas un organe producteur d'alexine: cette substance si importante dans la défense de l'organisme contre les cellules étrangères, semble être d'origine hépatique, d'après les recherches récentes de M. Nolf de Liège. Mais la sécrétion thyroïdienne, ainsi que l'a montré

1) Railliet, Traité de zoologie médicale. 1895. p. 402.

2) Linton, Occurrence of *Ascaris mystax* in a Lion. (The Veterinary Journal. Vol. XII. 1905. p. 21.)

3) Nolf, Origine du complément hémolytique. (Bull. de l'Acad. Royale de Belgique. Classe d. scienc. 1908. No. 9—10. p. 748—772.)

Mlle Fassin¹⁾ jouit de la propriété d'exciter les éléments générateurs de l'alexine: Par un mécanisme qui n'est pas encore élucidé, les extraits thyroïdiens, qu'ils soient administrés par la voie gastrique ou par le tissu sous-cutané, augmentent d'une manière très sensible, la quantité d'alexine hémolytique et bactéricide du sérum. Chez les animaux privés de corps thyroïde, au contraire, Mlle Fassin a constaté un abaissement prononcé et très rapide de la teneur du sang en complément.

Les données de Mlle Fassin ont été confirmées par M. Marbé au laboratoire de Delezenne de l'Institut Pasteur. Cet observateur²⁾ a fait connaître les relations qui existent entre le corps thyroïde et la teneur du sang en opsonines normales, lesquelles ne sont autres que les alexines d'après la plupart des savants qui se sont spécialisés dans l'étude des anticorps.

Récemment, Mlle Fassin³⁾ poussant plus loin ses investigations, a trouvé que dans l'hypersécrétion de l'alexine sous l'influence de produits thyroïdiens l'iode que renferment ces derniers, doit jouer un rôle important: en administrant aux animaux sains du liquide de Lugol, de l'albumine iodée, de l'iodipine on constate une augmentation de la teneur du sérum en alexine, phénomène qui ne se manifeste pas si l'on donne d'autres produits contenant au lieu d'iode, des substances de la même famille, telle la bromipine pr. ex.

Ces résultats si intéressants m'ont paru dignes d'être vérifiés et complétés: j'ai donc recherché quelle était chez le chien et le lapin, l'influence de l'injection et de l'ingestion de produits thyroïdiens, sur le pouvoir hémolytique global du sérum, sur son pouvoir alexique et enfin sur le pouvoir sensibilisateur, que certains sérums, celui de chien notamment, possèdent à l'égard d'hématies d'autres espèces, et qui constitue la condition essentielle du pouvoir hémolytique naturel de ces sérums.

Voici la technique que j'ai suivie pour ces recherches:

1) Détermination du pouvoir hémolytique global: 5 c.c. d'hématies de lapin lavées 6 fois et diluées au $\frac{1}{15}$, sont additionnées, sans sensibilisation préalable, de sérum actif de chien obtenu en centrifugeant le caillot pendant 10', 3 heures après la saignée. L'on dilue ce sérum au $\frac{1}{5}$ avec du NaCl 9‰ et l'on en emploie une quantité telle qu'au bout de deux heures de séjour à l'étuve, le mélange hématies-sérum centrifugé, donne une hémolyse d'environ 25%. L'on prépare alors des tubes de picro-carmin ayant une teinte absolument identique et pouvant se conserver très longtemps. Dans les expériences ultérieures il suffit alors, pour déterminer le degré d'hémolyse d'ajouter à un volume V du liq. d'hémolyse, un vol. d'eau salée v tel que la teinte soit absolument celle des tubes témoins. Le rapport $\frac{V+v}{V}$ est égal au rapport des pouvoirs hémolytiques et, dans le cas où l'un des constituants de l'hémolysine, alexine ou sensibilisatrice, reste en quantité constante, ce

1) Fassin, Louise, a) Influence du corps thyroïde sur les propriétés alexiques du sérum. b) Teneur du sérum en alexine chez les animaux thyroïdectomisés. (Travaux de l'Inst. bactériolog. de l'Université de Liège. — Compt. rend. des séances de la soc. de biol. de Paris. 1907. 9 et 16 mars, 20 avril.)

2) Marbé, Compt. rend. de la soc. de biol. T. LXIV. 1908. p. 1058.

3) Fassin, Rôle de l'iode dans l'augmentation des propriétés du sérum sous l'influence des produits thyroïdiens. (Soc. de biol. 1909. 20 mars.)

même rapport $\frac{V+v}{v}$ mesure, endéans certaines limites, le rapport des quantités de l'autre constituant (Rémy¹), Mioni²).

2) Pouvoir alexique: Au lieu d'hématies lavées et non sensibilisées, l'on emploie une même quantité d'hématies fortement sensibilisées, ce qui permet d'obtenir le même degré d'hémolyse avec une quantité de sérum actif, tellement faible que l'influence des sensibilisatrices normales y contenues devient absolument négligeable. Le pouvoir hémolytique est alors sensiblement proportionnel au pouvoir alexique du sérum, tout que celui-ci n'est pas en quantité suffisante pour donner une hémolyse totale. Mêmes déterminations colorimétriques que ci-dessus.

3) Pouvoir sensibilisateur: Les sensibilisatrices normales sont, on le sait, très fragiles et surtout, très thermolabiles, moins cependant que les alexines, dans le cas particulier du sérum de chien: Aussi un chauffage d'une $\frac{1}{2}$ heure à 49° peut inactiver ce sérum de chien sans entamer notablement son pouvoir sensibilisateur. Ajoutant alors à des globules de lapin lavés (émulsion au $\frac{1}{15}$, 5 c.c.) un excès de sérum alexique de cobaye et une quantité insuffisante de sérum sensibilisateur préparé de la sorte, nous aurons une hémolyse sensiblement proportionnelle au pouvoir sensibilisateur du sérum inactivé. Il n'en est pas moins vrai que la détermination du pouvoir sensibilisateur est toujours peu précise. L'on pourrait, du reste, se passer de la faire, car dans la recherche du pouvoir hémolytique global, comme le sérum actif employé ainsi que la plupart des sérums normaux, contient toujours un grand excès de complément, comparativement à la teneur en ambocepteurs normaux, ce sont les variations de ceux-ci qui influent le plus sur l'intensité de l'hémolyse, et sauf dans les cas où le complément subit une diminution considérable (voir plus loin, influence de la thyroïdectomie), la courbe représentative du pouvoir hémolytique global se superpose sensiblement à celle du pouvoir sensibilisateur.

Ceci dit, voici les résultats que j'ai obtenus:

1) Les extraits thyroïdiens, en injection sous-cutanée aussi bien qu'en ingestion, déterminent chez le lapin et surtout chez le chien, une augmentation du pouvoir hémolytique global du sérum qui atteint son maximum au bout d'un jour environ. Cette augmentation ne porte pas seulement sur les alexines mais encore sur les sensibilisatrices normales.

2) Une deuxième injection d'une même quantité de produits thyroïdiens faite quand l'effet de la première, à peu près disparu, produit un effet au moins égal et très généralement beaucoup plus marqué que la 1^e.

3) Chez les chiens ecthyroïdés totalement, la diminution du pouvoir hémolytique porte à la fois sur les sensibilisatrices normales et les alexines.

Voici à titre d'exemple les résultats d'expériences faites sur les chiens I et II:

L'on détermine à plusieurs reprises le pouvoir hémolytique global, alexique et sensibilisateur de leurs sérums.

1) Rémy, Dosage des substances actives des sérums hémolytiques. (Ann. de l'Inst. Pasteur. 1906. p. 1018.)

2) Mioni, Contribution à l'étude des hémolysines naturelles. (Ann. de l'Inst. Pasteur. 1905. p. 84.)

Représentons par 1 la moyenne des résultats obtenus. Les deux chiens sont thyroïdectomisés le même jour, le chien I est abandonné à lui même.

Le chien II est soumis immédiatement à un traitement thyroïdien intensif: 8 tabloïds de Burroughs, de 0,3 g par jour.

Au bout de 6 jours, le pouvoir hémolytique du sérum de I a baissé, au point qu'il en faut 3 fois plus pour produire le même degré d'hémolyse. Baisse plus marquée encore pour le pouvoir alexique.

Au contraire chez le chien II (traitement thyroïdien) au bout de 6 jours, pouvoir hémolytique global égal à 2,15, pouvoir alexique égal à 1,5.

L'on interrompt alors le traitement thyroïdien et il se produit immédiatement une chute du pouvoir hémolyt. et du p. alex.

7 ^e jour p. h. = 1,85	p. alex. = 1,4
8 ^e " " = 1,80	" " = 0,84
9 ^e " " = 1,60	" " = 0,5
10 ^e " " = 0,5	" " = 0,35

Immédiatement après ce dernier essai, l'on recommence le traitement thyroïdien: 12 tabloïds de 0,3 le

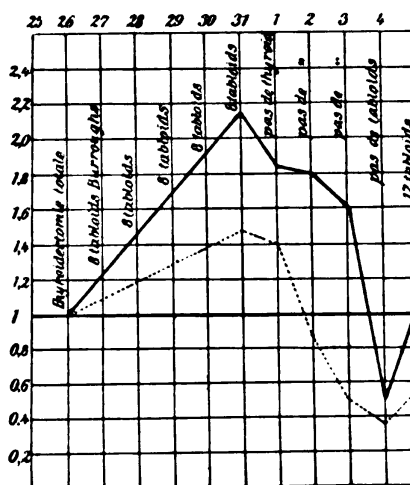
11 ^e jour p. h. = 1,08	p. alex. = 0,55
-----------------------------------	-----------------

Tableau I. Variations du pouvoir hémolytique global et du pouvoir alexique du sérum chez le chien II thyroïdectomisé et soumis au traitement thyroïdien intermittent.

Le traitement a été pratiqué jusque dans la matinée du 31.

Puis on cesse jusqu'au 4. Et le 4, on donne de nouveau 12 tabloïds soit environ 4 g de glande. La ligne pleine représente le pouvoir hémolytique, la ligne pointillée = alexine.

Il n'a pas été fait de détermination du pouvoir hémolytique et alexique du 26 au 31, pour éviter l'influence perturbatrice que pourrait exercer le traumatisme. Au bout de ce temps l'animal ayant été opéré aseptiquement, est à peu près guéri. Les tabloïds sont donnés en 2 fois, 4 au matin, 4 au soir (les 4 premiers, 5 heures avant l'essai du sang). Cependant, le 31, les 8 comprimés ont été administrés au matin.



Ainsi donc, en l'absence de corps thyroïde, le traitement thyroïdien, à condition d'être assez intensif peut non seulement empêcher la diminution des propriétés alexique et sensibilisatrice¹⁾ du sérum, mais même les rendre supérieures à ce qu'elles étaient avant l'opération; et les rétablir, si on les laisse déchoir, en interrompant momentanément le traitement thyroïdien.

Un dernier mot à ce sujet: Marbé²⁾ avait déjà constaté que chez les myxœdémateux, le pouvoir opsonique redevient égal ou supérieur à la normale, après un traitement thyroïdien assez intensif. Mais il ne s'agissait, comme on le peut voir, dans ce cas, que d'insuffisance

1) L'augmentation de la propriété sensibilisatrice a été l'objet de déterminations spéciales que je crois inutiles de rapporter ici car cette augmentation ressort déjà très clairement de ce fait que le pouvoir hémolytique global croît bien plus fort que le pouvoir alexique, ce qui ne peut s'expliquer que par un accroissement du pouvoir sensibilisateur.

2) Marbé, Compt. rend. soc. de biol. 1908. No. 36.

thyroïdienne, et non pas d'une absence totale du corps thyroïde comme dans les expériences rapportées ci-dessus¹⁾.

En ce qui concerne la substitution des produits iodés artificiels aux extraits thyroïdiens eux-mêmes, voici ce que j'ai observé:

Je me suis adressé à l'iodipine à 10% par ce que cette spécialité composée d'huile et d'iode, possède l'avantage d'être bien supportée même à dose considérable, qu'elle peut s'administrer par la voie gastrique aussi bien que par la voie sous-cutanée, enfin, que l'iode introduit sous cette forme dans l'organisme, y persiste longtemps. La dose employée pour la 1^{re} injection était constamment de 2 c.c. par kg d'animal (chien ou lapin). Les expériences ont porté sur 6 chiens et 4 lapins. Les graphiques ci-contre nous donnent les résultats pour deux d'entre eux.

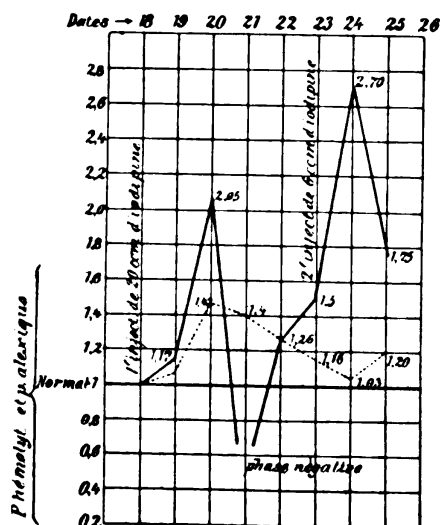


Tableau II.

Tableau II. Influence de l'iodipine sur le pouvoir hémolytique global et alexique du sérum du chien VI (chien de 10 kg environ).

—— pouvoir hémolytique;

..... pouvoir alexique.

La courbe du pouvoir sensibilisateur n'a pas été figurée sur le graphique pour ne pas l'embrouiller, elle correspond du reste sensiblement à la courbe du pouvoir hémolytique global et présente la même phase négative.

Tableau III. Influence de l'iodipine sur le pouvoir hémolytique global — et sur le pouvoir alexique du sérum du chien IV (chien de 7 kg environ).

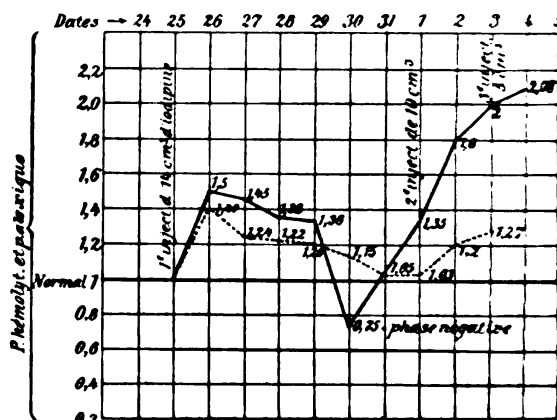


Tableau III.

Ces graphiques montrent très nettement:

1) Qu'une première injection détermine chez le chien une augmentation concordante du pouvoir alexique et de la propriété hémolytique globale, se manifestant déjà nettement après 24 heures, atteignant son maximum après le 3^e ou le 4^e jour, parfois plus tard encore, dans un seul cas dès le 2^e. L'augmentation du pouvoir hémolytique global l'emporte de beaucoup sur celle du pouvoir alexique et des dosages faits par les méthodes susdites, montrent que cela tient à une augmentation considérable des ambocepteurs normaux. Une fois le maximum atteint, le pouvoir sensibilisateur diminue assez rapidement et même — fait paradoxal — un ou deux jours après, on le trouve souvent très

1) Le chien II a succombé avec tous les symptômes de la cachexie strumipriva, 5 jours après la cessation du traitement: Preuve que la thyroïdectomie était bien complète.

inférieur à la normale, mais il remonte rapidement, et demeure, dans les jours suivants, sensiblement supérieur à 1. Quant au pouvoir alexique une fois le maximum atteint, il tombe graduellement mais il ne m'a pas paru présenter la phase négative constatée pour la sensibilisatrice.

2) Si on administre une seconde fois l'iodipine, même en quantité beaucoup moins forte, son effet est toujours notablement plus marqué que celui de la 1^e injection (voir graphiques). Le maximum pour le pouvoir hémolytique global peut atteindre 3. Le pouvoir alexique se montre également plus fort qu'après la 1^e injection, mais son augmentation est toujours inférieur à l'accroissement de la propriété sensibilisatrice.

3) En outre, tandis que l'opothérapie thyroïdienne chez les animaux thyroïdectomisés rétablit, et même au-delà, l'intégrité des propriétés alexiques et sensibilisatrices de leur sérum, il m'a paru que chez ces animaux l'administration d'iodipine est impuissante à empêcher la chute progressive des pouvoirs alexique et sensibilisateur du sérum¹⁾.

En résumé, l'on peut dire:

Que chez les animaux sains, à corps thyroïde intact, l'iodipine (et sans doute les autres composés iodés) exerce sur le pouvoir hémolytique du sérum une action superposable à celle de l'opothérapie thyroïdienne mais plus lente à se produire, semble-t-il.

Que chez les animaux privés de leur corps thyroïde, l'iodipine est d'une inefficacité absolue.

L'on ne pourrait mieux expliquer cette différence si profonde, qu'en admettant que c'est par l'intermédiaire du corps thyroïde que l'iode influence la propriété hémolytique du sang.

L'on pourrait être tenté d'expliquer l'augmentation du pouvoir hémolytique, par l'apparition dans le sang de l'animal, à la suite des injections, d'une substance hémolytique particulière telle une combinaison particulière d'iode, ou un lipoïde hémolytique. Mais a) la recherche de l'iode dans le sang au moment où les effets susdit se produisent à leur maximum, ne permet pas d'en déceler des traces appréciables même dans des quantités de sang 200 fois supérieures à celles employées pour les hémolyses²⁾ (sérum actif); b) en évaporant le sérum dans le vide et reprenant par l'alcool³⁾, l'on obtient un extrait qui desséché et émulsionné dans du liq. physiolog., ne montre pas la moindre trace de pouvoir hémolytique, ce qui exclut la présence de lipoïdes; c) enfin, et ceci me

1) L'iodipine a paru ne pas influencer non plus, les phénomènes cachectiques, car les animaux qui l'ont reçue, sont morts en moins d'une semaine après la thyroïdectomie.

2) J'utilisai en effet pour y rechercher l'iode, une quantité de sérum variant de 5 à 8 c. c. Ce sérum était absorbé par de la chaux, le mélange placé dans un tube à combustion, recouvert de quelques c. m. de chaux pure, et le tout chauffé au rouge, puis repris par HNO₃, le filtrat traité par une solution sulfurique d'acide nitreux qui devait libérer l'iode fixé sur la chaux par la calcination. En ajoutant alors un peu de sulfure de carbone, tout l'iode se fixe sur ce dissolvant qu'il colore en violet plus ou moins intense.

Les résultats de ces essais ont été constamment négatifs, sauf dans un cas où le CS₂ s'est coloré en violet mais si faiblement que la quantité d'iode devait être considérée comme indosable, inférieure à $\frac{1}{30}$ mg soit moins de $\frac{1}{150000}$ de la masse de sang employée, ou pour les 20 cg de sérum qu'exige une hémolyse, moins de $\frac{1}{750}$ mg d'iode!! Je ne sache pas qu'il y ait parmi les substances chimiquement définies, d'hémolysines agissant à dose aussi minime! Et cette quantité était encore bien moindre dans les autres cas puisque elle ne parvenait pas à colorer le sulfure de carbone.

3) La quantité de sérum employée était d'environ 2 cm³.

paraît absolument décisif, le sérum frais chauffé à 56° pendant 1/2 heure perd absolument tout pouvoir hémolytique même à des doses douze ou quinze fois supérieures à celles utilisées couramment pour les hémolyses.

Il semble donc que l'iodipine agisse uniquement sur les hémolysines normales du sérum.

Je me propose de rechercher ultérieurement: 1) Si les injections d'iodipine longtemps continuées, peuvent maintenir d'une façon durable l'augmentation du pouvoir hémolytique et bactéricide du sang; 2) si d'autres composés iodés tels que les iodalbuminoïdes agissent pareillement, et montrent la même dépendance vis-à-vis du corps thyroïde; 3) enfin quelle peut être l'influence des composés en question sur l'évolution des infections.

Liège, Mars 1909.

Nachdruck verboten.

Bemerkungen zu dem Artikel von R. Emmerich und O. Löw „Zur Kenntniss der bakteriziden Eigenschaften der Pyocyanase“¹⁾.

Von **Hugo Raubitschek**, Prosektor, Czernowitz.

R. Emmerich und O. Löw haben es abermals versucht, in einer Entgegnung, die die Grenzen des wissenschaftlichen Disputes weit überschreitet, unsere Annahme²⁾, daß die koktostabile bakterizide Eigenschaft der Pyocyanase auf das Vorhandensein von Lipoiden resp. Seifen in derselben zu beziehen sei, zu widerlegen. Es ist überflüssig, auf ihre zahllosen Entstellungen und falschen Interpretationen unserer Arbeit näher einzugehen, um so weniger, als Emmerich und Löw auch diesmal nicht ein neues Experiment anzuführen imstande sind, das gegen unsere Annahme resp. für die Fermentnatur spricht.

Wir erklären eine derartige Diskussion endgültig für erledigt und überlassen die Kritik unserer Versuche mit gutem Recht und ruhigem Gewissen Fachkollegen, die an der Brauchbarkeit und Verwendbarkeit des Mittels „Pyocyanase“ in jeder Beziehung ebenso wenig interessiert sind, wie wir.

1) Centralbl. f. Bakt. etc. Abt. I. Orig. Bd. XLIX. Heft 4. p. 571.

2) Raubitschek u. Russ, Centralbl. f. Bakt. etc. Abt. I. Orig. Bd. XLVIII.

Nachdruck verboten.

Ueber die desinfizierende Kraft des absoluten Amylalkohols im kochenden und im Dampfzustande.

[Aus dem Institut für Hygiene der Kgl. Universität zu Parma
(Vorstand: Prof. E. Bertarelli).]

Von Dr. Icilio Bocchia.

Ins Deutsche übertragen von Dr. K. Rühl-Turin.

Koch war der erste, welcher sich mit der desinfizierenden Wirkung der Alkohole befaßte; bei seinen Untersuchungen über das bakterizide und sporizide Vermögen der Alkohole beobachtete er, daß die Desinfektionskraft der absoluten Alkohole sehr schwach ist, so daß sich z. B. die Milzbrandsporen im kalten absoluten Alkohol 110 Tage lebensfähig erhalten konnten. Diese Widerstandsfähigkeit hat Frank durch die Wirkung des Alkohols auf die Hülle der Bakterien erklärt, welche infolge der Wasserentziehung zusammenschrumpft und den inneren und vitalen Teil des Mikroorganismus schützt. Weitere Untersuchungen über diesen Gegenstand wurden von Ahsfeld ausgeführt, welcher beobachtete, daß verdünnte Alkohole eine größere desinfizierende Kraft besitzen als die absoluten Alkohole. Die bakterizide Wirkung des verdünnten Alkohols erklärt Frank durch die Wirkung des zur Verdünnung zugesetzten Wassers, welches eine Erweichung der Bakterienhülle bewirkt und letztere auflöst, und somit dem Alkohol oder seinen Dämpfen erlaubt, in das Innere der Bakterienzelle einzudringen.

Saul, Repin, Salvader, Potain, Minervini, Epstein u. a. haben diese Annahme bestätigt; Saul, Leig, Bruns, Frank, Bertarelli haben schon die sporizide und bakterizide Wirkung des absoluten wie verdünnten kochenden Methyl-, Aethyl- und Propylalkohols untersucht.

Diese Autoren haben gefunden, daß diese Alkohole im kochenden Zustande fast keine Desinfektionskraft besitzen, ebenso wie die Wirkung der von kochenden absoluten Alkoholen entwickelten Dämpfe eine, obwohl größere, doch sehr geringe ist, während man durch Verdünnung der Alkohole innerhalb gewisser Konzentrationsgrenzen ein ziemlich hohes bakterizides und sporizides Vermögen erzielt. Eine prompte und starke Wirkung entfaltet Aethylalkohol in einer 40—50-proz. Verdünnung, Methylalkohol in einer 30—40- und Propylalkohol in einer 30—40-proz. Wenn man eine gewisse Konzentrationsgrenze überschreitet, welche man als kritischen Punkt bezeichnen könnte, fällt die Desinfektionskraft der kochenden Mischungen rasch auf 0 herab.

So besitzen z. B. die Dämpfe des 90—95-proz. Aethylalkohols keine sporizide Wirkung, während die Dämpfe des 40—55-proz. Aethylalkohols in ihrer Wirkung dem strömenden Wasserdampf gleichen. Es wurde außerdem die sonderbare Tatsache beobachtet, daß die Alkoholdämpfe bei der minimalen Konzentration von 10 Proz. vollständig wirkungslos sind.

Wie gesagt, beziehen sich die von den verschiedenen Autoren bis jetzt ausgeführten Untersuchungen über die Desinfektionskraft der Alkohole auf Aethyl-, Propyl- und Methylalkohol und auf Amylalkohol im kalten

Zustande. Mit dem Desinfektionswert des absoluten Amylalkohols im kochenden oder im dampfförmigen Zustande und mit der Wirkung einer Mischung solcher Dämpfe mit Wasserdämpfen hat man sich bis jetzt wenig befaßt. Die diesbezüglichen Untersuchungen sind spärlich und nicht übereinstimmend, und bei denselben wird oft die Rolle, welche die Hitze bei der desinfizierenden Wirkung spielt, außer acht gelassen.

Chemisch kennt man drei verschiedene, dem Fuselöl ähnelnde Amylalkohole, welchen nach sorgfältigen Untersuchungen eine und dieselbe Formel zugeschrieben wurde ($C_5H_{12}O$). Dieselben stellen unangenehm riechende und in Wasser unlösliche Flüssigkeiten dar. Sie besitzen identische chemische Eigenschaften und die physikalischen Charaktere gleichen sich auch, wenn man von dem Unterschiede absieht, daß das polarisierte Licht von dem einen Isomer nach rechts, vom zweiten nach links abgelenkt und von dem dritten unverändert durchgelassen wird. Der bei meinen Versuchen angewendete Amylalkohol lenkte das polarisierte Licht nach links. Ebullitionstemperatur = $129-132^{\circ} C$.

Um das Desinfektionsvermögen des kochenden absoluten Amylalkohols zu untersuchen, bin ich folgendermaßen vorgegangen: Mit Kulturen von gekeimten (Sporen) Milzbrandbacillen habe ich vorher sterilisierte Bäuschchen aus Glaswolle infiziert und dann dieselben im Exsikkator durch Schwefelsäure 3 Tage lang getrocknet. Nachdem ich so das Material für meine Untersuchungen bereitet hatte, habe ich mehrere dieser infizierten Glaswollbäuschchen in kochenden, in einem Erlenmeyerschen Glas enthaltenen Alkohol eingetaucht und dann nacheinander mit einem Zwischenraum von 5 Minuten wieder herausgezogen. Durch wiederholtes Eintauchen in sterilisiertes Wasser habe ich sie vom Amylalkohol befreit, welcher eventuell noch an ihnen anhaften konnte, wonach ich sie in sterile Bouillon enthaltende Glasröhren einführte und diese bei $37^{\circ} C$ in einen Roux'schen Brutschrank stellte.

Nach 4 Tagen habe ich diese Kulturflüssigkeiten untersucht; bei den mit einem $+$ -Zeichen bezeichneten Versuchen konnte ich Milzbrandbacillen nachweisen, bei den übrigen war der bakteriologische Befund negativ.

Versuch	Die Sporen wurden in der Trockenheit gehalten	Dauer der Immersion in kochendem absoluten Amylalkohol									
		1'	5'	10'	15'	20'	25'	30'	35'	40'	45'
No. 1	5 Tage	+	+	+	+	+	+	—	—	—	—
" 2	7 "	+	+	+	+	+	+	+	—	—	—
" 3	8 "	+	+	+	+	+	+	—	—	—	—
" 4	9 "	+	+	+	+	+	—	+	—	—	—

Die Sporen des Milzbrandbacillus haben dem kochenden absoluten Amylalkohol 30 Minuten widerstanden.

Um die Wirkung der Dämpfe des absoluten Amylalkohols zu untersuchen, habe ich mich eines Glaskolbens mit weitem Hals und zweimal durchlöcherterem Stöpsel bedient. In das eine Loch habe ich eine 0,50 m lange Glasröhre eingeführt, welche als Kondensator diente, und in das andere einen Celsiusthermometer. An den unteren Teil des Stöpsels habe ich lange Nadeln mit umgebogener Spitze befestigt, an welche die

mit Milzbrandsporen infizierten Glaswollbäuschchen angehängen wurden, auf welche die im Glaskolben sich entwickelnden Dämpfe des absoluten Amylalkohols ihre Wirkung ausüben sollten. Bei der Einrichtung habe ich besonders dafür gesorgt, daß die Glaswollbäuschchen nicht durch den Amylalkohol benetzt wurden, welcher sich durch Kondensation bildete und während der Ebullition vom Kondensationsrohr zurückfiel. Die Entfernung des Glaswollbäuschchens von der verdampfenden Fläche war nie größer als 2 cm. Die wiederholt kontrollierte Temperatur der Dämpfe schwankte zwischen 127 und 128° C.

Versuch	Die Sporen wurden in trockenem Zustande gehalten	Dauer der Einwirkung der Dämpfe von kochendem absoluten Amylalkohol									
		30"	1'	2'	3'	4'	5'	6'	7'	8'	9'
No. 1	4 Tage	+	+	+	+	+	—	—	—	—	—
" 2	6 "	+	+	+	+	+	—	—	—	—	—
" 3	8 "	+	+	+	+	—	—	—	—	—	—
" 4	10 "	+	+	+	+	+	—	—	—	—	—

Die Sporen des Milzbrandbacillus haben den Dämpfen des kochenden absoluten Amylalkohols bei einer Temperatur von 127—128° C 4 Minuten widerstanden.

Da es nicht möglich war, Untersuchungen auszuführen über das bakterizide und sporizide Vermögen des in verschiedenem Verhältnis mit Wasser verdünnten Amylalkohols, weil letzterer infolge seines Molekulargewichtes auf dem Wasser schwimmt und die zwei Flüssigkeiten einen verschiedenen Siedepunkt besitzen, habe ich die desinfizierende Wirkung der gemischten Dämpfe des Amylalkohols und des Wassers in der Weise untersucht, daß ich sie getrennt in zwei durch eine kurze Röhre verbundenen Erlenmeyerschen Gläsern entwickeln ließ. In dem einen dieser Gläser ließ ich das Wasser sieden und leitete die Dämpfe in das zweite, den kochenden Amylalkohol enthaltende; der Stöpsel dieses zweiten Gefäßes war mit zwei Löchern versehen, durch deren eines die Dämpfe frei herausströmen konnten. Da die Dämpfe des kochenden Amylalkohols eine hohe Temperatur besaßen, bewirkten sie, indem sie mit den kälteren Wasserdämpfen in Berührung kamen, eine Ueberhitzung dieser letzteren und infolgedessen eine Steigerung ihrer Desinfektionskraft.

Mit der bei den vorigen Versuchen beschriebenen Technik wurden die mit Milzbrandsporen infizierten Glaswollbäuschchen der Wirkung der eben beschriebenen Mischung von Dämpfen ausgesetzt.

Versuch	Die Sporen wurden in trockenem Zu- stande gehalten	Dauer der Einwirkung der gemischten Amylalkohol- und Wasserdämpfe										
		30"	45"	1'	2'	3'	4'	5'	6'	7'	8'	9'
No. 1	4 Tage	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—
" 2	6 "	+	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—
" 3	8 "	+	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—
" 4	10 "	+	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—
" 5	12 "	+	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—

Die Sporen des Milzbrandbacillus haben der Mischung von überhitzten Wasserdämpfen und Dämpfen von kochendem absoluten Amylalkohol 1 Minute widerstanden. Die gemischten Dämpfe hatten eine Temperatur von 120° C.

Um einen Versuch anzustellen, habe ich auch die Wirkung des strömenden Wasserdampfes untersucht. Nach den verschiedenen Autoren ist der von den Milzbrandsporen gegen strömende Wasserdämpfe geleistete Widerstand verschieden.

Montella hat einige gefunden, welche sogar 45 Minuten bei einer Temperatur von 100° C widerstanden; es hat aber niemand nachweisen können, daß es solche gibt, welche über 60 Minuten widerstehen. Esmarch hat gefunden, daß sie 3—7 Minuten bei 100° C widerstehen, Rubner 2—4, Duclaux 4, Bordoni 10—12, Zirolgia 8, Lehmann und Neumann 2—5 Minuten. Man nimmt jedoch im allgemeinen an, daß Milzbrandsporen nicht mehr als 1—5 Minuten bei 100° C widerstehen.

Die Sporen, welche ich untersucht habe, haben gegen die strömenden Wasserdämpfe bei 100° C einen 6 Minuten langen Widerstand geleistet.

Versuch	Die Sporen wurden in trockenem Zu- stande gehalten	Dauer der Einwirkung des strömenden Wasserdampfes											
		15''	30''	45''	1'	2'	3'	4'	5'	6'	7'	8'	
No. 1	4 Tage	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—	
„ 2	6 „	+	+	+	+	+	+	+	—	+	—	—	
„ 3	8 „	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—	—	
„ 4	10 „	+	+	+	+	—	+	+	+	+	—	—	

Die dargelegten Resultate über die Desinfektionskraft des Amylalkohols beweisen, daß dieser Alkohol sich im flüssigen Zustande anders als im Dampfzustande verhält, genau wie es bei dem Methyl-, Aethyl- und dem Propylalkohol der Fall ist.

Das bakterizide und sporizide Vermögen des kochenden absoluten Amylalkohols ist sozusagen = 0 (30 Minuten bei 129—132° C); es erscheint sogar hierbei die einfache von der Hitze abhängende desinfizierende Wirkung bedeutend eingeschränkt resp. verlangsamt.

Die Dämpfe des kochenden absoluten Amylalkohols haben eine ziemlich große Desinfektionskraft, welche auch diejenige des strömenden Wasserdampfes übertrifft; man muß jedoch darauf Rücksicht nehmen, daß die Dämpfe des kochenden Amylalkohols eine höhere Temperatur haben (120° C).

Aus den Resultaten meiner Versuche geht der große Unterschied deutlich hervor, welcher zwischen der zur Sterilisierung durch kochenden absoluten Alkohol und der zur Sterilisierung durch die Dämpfe desselben bei ungefähr der gleichen Temperatur erforderlichen Zeit besteht. Der kochende absolute Amylalkohol hat nämlich, um die Milzbrandsporen zu töten, eine 6mal längere Zeit gebraucht als seine Dämpfe.

Die desinfizierende Wirkung des kochenden Amylalkohols und seiner Dämpfe wird besonders oberflächlich ausgeübt; die durchdringende Wirkung ist sehr gering.

Sehr groß ist das desinfizierende Vermögen der Mischung von Dämpfen von kochendem Amylalkohol mit Wasserdämpfen. Diese besonders starke Wirkung ist größtenteils auf die durch die Berührung mit den Amylalkoholdämpfen bewirkte Uebererhitzung der Wasserdämpfe zurückzuführen. Bei dem gegenseitigen Kontakt der Dämpfe der beiden siedenden Flüssigkeiten neigen diese Dämpfe dazu, ihre Temperatur in ein Gleichgewicht zu bringen; infolgedessen erfährt der Wasserdampf

eine Uebererhitzung, während die Amylalkoholdämpfe sich zum Teil kondensieren und zum Teil im Dampfzustande bleiben.

Zu der beträchtlichen desinfizierenden Wirkung der Mischung dieser strömenden Dämpfe trägt neben der hohen Temperatur der übererhitzten Wasserdämpfe auch die Anwesenheit dieser letzteren selbst bei, welche die durch den Amylalkohol ausgeübte deshydratierende Wirkung auf die Kapseln der Mikroorganismen verhindert und hinhält, und infolgedessen die bakterizide und sporizide Wirkung der Alkohol- und Wasserdämpfe befördert.

Die Mischung von Amylalkohol- und Wasserdämpfen hat eine bedeutende und prompte desinfizierende Wirkung, ist leicht anzuwenden und bietet besonders den großen Vorteil dar, daß man im Laboratorium ohne besondere Apparate eine Sterilisierung durch übererhitzte Wasserdämpfe ausführen kann.

Nachdruck verboten.

Die Einwirkung des Sublimats und der Karbolsäure auf den Typhusbacillus, den Cholera vibrio und einige andere bewegliche Bakterien¹⁾.

[Aus dem bakteriologischen Institut der Universität Moskau.]

Dem Andenken G. N. Gabritschewskis gewidmet.

Von Dr. **M. Liachowetzki**, Moskau.

Mit 3 Kurven.

Nachdem ich die Einwirkung verschiedener Sera auf die Beweglichkeit der Bakterien zum Gegenstand meiner Untersuchungen gemacht hatte, mußte sich bei mir natürlicherweise der Wunsch regen, den Einfluß anderer Stoffe auf diese Beweglichkeit zu studieren. Da nun die Beweglichkeit der Bakterien eine ihrer wichtigsten vitalen Funktionen bildet, so wandte ich mich für den Anfang der Gruppe der Desinfektionsstoffe zu, deren Einwirkung auf die vitalen Funktionen überhaupt sicher festgestellt ist. Von den Vertretern der genannten Gruppe wählte ich das Sublimat und die Karbolsäure, deren Ansehen als verlässliche Desinfektionsmittel bis heute noch nicht erschüttert ist, trotzdem diese Gruppe von Mitteln in letzter Zeit eine erhebliche Bereicherung erfahren hat.

Für meine Versuche benutzte ich stets wässrige Lösungen der bezeichneten Stoffe.

Die angewandte Beobachtungsmethodik ist in ihren wesentlichen Zügen dieselbe geblieben, wie bei meinen früheren Untersuchungen²⁾.

Ich experimentierte hauptsächlich mit Cholera vibrionen und Typhusbacillen; dabei benutzte ich im Verlaufe meiner gesamten Arbeit eine und dieselbe Kultur, jedoch in der Weise, daß für jeden neuen Versuch als Material eine Ueberimpfung von der Kultur eines der beiden vorausgehenden letzten Versuche diente; zur Anwendung kam stets eine 24 Stunden alte Kultur.

1) Vortrag, gehalten im Oktober 1908 in der Bakteriolog. Gesellschaft zu Moskau.

2) Centralbl. f. Bakteriolog. Abt. I. Referate. Bd. XXXVIII. 1906.

Ich gehe nun zur ausführlichen Darstellung der erzielten Resultate über:

Sublimat.

Die Gesamtzahl der mit dem Typhusbacillus ausgeführten Versuche betrug 148. Nach der Art ihrer Wirkung können sämtliche von mir untersuchte Sublimatverdünnungen in 4 Gruppen verteilt werden; die besondere Wirkungsart einer jeden von ihnen tritt sehr deutlich auf der nebenstehenden Tabelle No. 1 zutage.

Tabelle No. 1.
Bacillus typhi abdominalis.

	Sublimat in Verdünnungen			
	1:5000	1:6000 —34 000	1:46 000 —101 000	1:202 000 —404 000
Von der Gesamtzahl der Versuche	12	85	39	12
Abtötung der Bakterien	7 = 58,3 %	19 = 22,3 %	0	0
Hemmung der Bewegungen	5 = 41,7 %	56 = 66 %	33 = 84,6 %	10 = 83,4 %
Beschleunigung der Bewegungen	0	6 = 7,1 %	4 = 10,3 %	1 = 8,3 %
Schnelligkeit unverändert	0	4 = 4,6 %	2 = 5,1 %	1 = 8,3 %

Diese Tabelle zeigt in sehr anschaulicher Weise, daß die Schnelligkeit der Bewegung in einer äußerst geringen Anzahl von Versuchen völlig unverändert geblieben ist, und zwar in 7 von 148, d. h. in 4,7 Proz., ein Umstand, der von der gewaltigen aktiven Energie zeugt, welche dem Sublimat hinsichtlich des Typhusbacillus eigen ist. Außerdem muß darauf hingewiesen werden, daß der Prozentsatz der Fälle, wo die Schnelligkeit keine Veränderung erlitt, wie aus der Tabelle ersichtlich, der Abschwächung des Sublimattitres parallelgehend anwuchs.

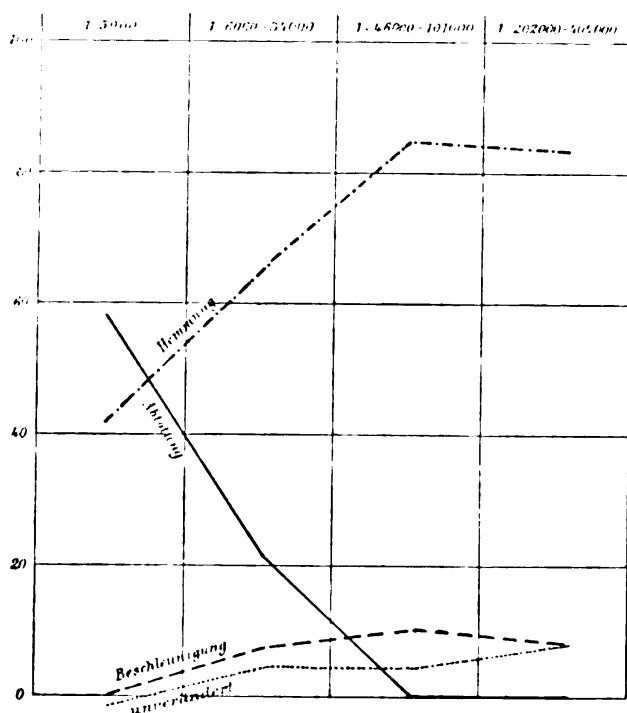
Die Fälle von Beschleunigung der Bewegung entfallen im allgemeinen auf die schwächeren Lösungen, sie wurden im ganzen 11mal verzeichnet, d. h. in 7,4 Proz. sämtlicher Versuche; hier jedoch erfuhr der Prozentsatz der Versuche der in Rede stehenden Kategorie, wie ersichtlich, nur eine geringe Veränderung mit der Abschwächung der angewandten Konzentrationen des Sublimats.

Ferner ist aus der Tabelle zu ersehen, daß der Prozentsatz der Versuche betr. Abtötung der Bakterien — 17,6 Proz. auf die Gesamtzahl der Versuche berechnet — sehr groß ist bei unserem kräftigen Titre, sehr erheblich sinkt bei den unmittelbar nach ihm folgenden schwächeren Sublimatlösungen, um bei weiterer Verdünnung des Mittels gar nicht mehr verzeichnet zu werden.

Am ausgesprochensten jedoch tritt auf dieser Tabelle die Hemmung der Bewegungen hervor, sie wurde bei unseren sämtlichen Titern beobachtet; die Häufigkeit der Fälle von Bewegungshemmung wächst recht deutlich mit der Abschwächung des Titors an, und der maximale Prozentsatz der Versuche mit einem solchen Effekt entfällt gerade auf unsere schwächsten Sublimatlösungen. Somit ist die Bewegungshemmung oder die Depression der lokomotorischen Funktion, die in 70 Proz. sämtlicher Versuche verzeichnet wurde, als der Grundeffekt der Sublimatwirkung anzusehen, wenigstens innerhalb der Grenzen derjenigen Verdünnungen, welche von uns angewandt wurden.

Alle die oben beschriebenen Eigentümlichkeiten in dem Verhalten der verschiedenen Effekte der Einwirkung des Sublimats auf den Typhus-

bacillus in Abhängigkeit von der Konzentration allein treten mit größtmöglicher Deutlichkeit auf dem nebenstehenden Diagramm No. 1 hervor.



Kurve No. 1. Sublimat. *Bacillus typhi abdominalis*.

Die Tabelle No. 2 zeigt in sehr anschaulicher Weise, daß sämtliche Sublimatlösungen, angefangen von 1:5000, bis zur Verdünnung 1:34300, eine Abtötung der Bakterien hervorrufen können, der Unterschied zwischen den einzelnen Lösungen ist nur ein quantitativer, die stärkeren Titer besitzen im allgemeinen diese Eigenschaft in höherem Grade als die schwächeren. Außerdem äußerte sich die absolute Bakterizidität aller dieser Lösungen überhaupt mit größter Konstanz, wie aus der Tabelle erhellt, nur unter einer unumgänglichen Bedingung, nämlich daß die Dauer der Einwirkung des Sublimats nicht unter eine Stunde betrage, eine größere Einwirkungsdauer führte in der Regel stets zu einer Abtötung der Bakterien, sogar bei verhältnismäßig schwachen Lösungen wie 1:21000. Im Gegenteil hatte eine geringe und unzureichende Einwirkungsdauer der Lösungen der in Rede stehenden Kategorie, sogar der stärksten von ihnen, sehr häufig oder sogar beständig bloß eine Bewegungshemmung, d. h. eine Depression der lokomotorischen Funktion, zur Folge. Letzterer Umstand wird durch die Ergebnisse der Versuche mit den Verdünnungen 1:5000, 1:13500 und 1:21000 aufs beste illustriert. Man muß demnach im allgemeinen zu dem Schlusse kommen, daß dem Absterben der Typhusbacillen eine Hemmung ihrer Bewegungen, ein Erlöschen ihrer lokomotorischen Funktion vorausging.

Sublimatlösungen unter 1:34000 äußerten hingegen gar keine bakteriziden Wirkungen, sogar wenn die Einwirkungsdauer bis zu 5½ Stunden ausgedehnt wurde. Dafür aber wirkten hier einige Lösungen (1:46000 bis 1:101000) mit bewundernswerter Konstanz stets hemmend auf die

Tabelle
Sublimat. Bacillus

Dauer des Versuchs in Std.	Verdünnung	1:5000		1:6000		1:7600		1:11 000		1:13 500		1:15 200	
		absolut	in Proz.	absolut	in Proz.	absolut	in Proz.	absolut	in Proz.	absolut	in Proz.	absolut	in Proz.
0,25	Abtötung der Bakterien	1	16,7	—	—	—	—	0	0	1	16,7	0	0
	Hemmung der Bewegungen	5	83,3	—	—	—	—	6	100	3	50	3	100
	Beschleunigung der Bewegungen	0	0	—	—	—	—	0	0	0	0	0	0
0,5	Abtötung der Bakterien	—	—	—	—	—	—	0	0	0	0	1	33,3
	Hemmung der Bewegungen	—	—	—	—	—	—	3	100	3	100	2	66,7
	Beschleunigung der Bewegungen	—	—	—	—	—	—	0	0	0	0	0	0
1,0	Abtötung der Bakterien	6	100	2	66,7	2	66,7	1	25	2	66,7	2	66,7
	Hemmung der Bewegungen	0	0	1	33,3	1	33,3	3	75	1	33,3	1	33,3
	Beschleunigung der Bewegungen	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2,0	Abtötung der Bakterien	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	Hemmung der Bewegungen	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	Beschleunigung der Bewegungen	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	Abtötung der Bakterien	—	—	—	—	—	—	—	—	3	100	—	—
	Hemmung der Bewegungen	—	—	—	—	—	—	—	—	0	0	—	—
	Beschleunigung der Bewegungen	—	—	—	—	—	—	—	—	0	0	—	—
	Beschleunigung der Bewegungen	—	—	—	—	—	—	—	—	0	0	—	—

Beweglichkeit des Typhusbacillus, jedoch unter der unerläßlichen Bedingung, daß die Einwirkungsdauer nicht unter 2 Stunden beträgt; eine kürzere Einwirkungsdauer dieser Lösungen ergab keine konstanten Resultate.

Bei den schwächsten der von mir angewandten Lösungen (von 1:202 000 an) waren die Versuchsergebnisse nicht gleichartig.

Die von uns studierten Sublimatlösungen zerfallen somit hinsichtlich der Art ihrer Einwirkung auf den Typhusbacillus tatsächlich in 4 Kategorien: 1) Die einen (1:5000) sind vornehmlich bakterizid, sobald eine 1-stündige Einwirkungsdauer zugrunde gelegt wird; 2) andere Titer (1:46 000—101 000) wirken stets hemmend auf die Bewegung, das sind

No. 2.

typhi abdominalis.

1:17 600		1:21 000		1:25 800		1:34 300		1:46 —51 000		1:101 000		1:202 000		1:404 000	
absolut	in Proz.	absolut	in Proz.	absolut	in Proz.	absolut	in Proz.	absolut	in Proz.	absolut	in Proz.	absolut	in Proz.	absolut	in Proz.
0	0	—	—	—	—	—	—	0	0	0	0	—	—	—	—
3	100	—	—	—	—	—	—	2	50	2	66,7	—	—	—	—
0	0	—	—	—	—	—	—	1	25	0	0	—	—	—	—
0	0	0	0	0	0	0	0	—	—	—	—	—	—	—	—
3	100	3	100	1	33,3	3	100	—	—	—	—	—	—	—	—
0	0	0	0	0	0	0	0	—	—	—	—	—	—	—	—
0	0	0	0	1	16,7	1	16,7	0	0	0	0	—	—	0	0
6	100	2	66,7	4	66,7	1	16,7	8	88,9	3	60	—	—	3	100
0	0	1	33,3	1	16,7	4	66,6	1	10	2	40	—	—	0	0
—	—	0	0	—	—	—	—	0	0	0	0	—	—	—	—
—	—	3	100	—	—	—	—	3	100	3	100	—	—	—	—
—	—	0	0	—	—	—	—	0	0	0	0	—	—	—	—
—	—	3	100	—	—	—	—	0	0	0	0	0	0	0	0
—	—	0	0	—	—	—	—	3	100	9	100	5	83,3	2	66,7
—	—	0	0	—	—	—	—	0	0	0	0	0	0	1	33,3

ausschließlich die die Lokomotion deprimierenden Titer; 3) eine dritte Kategorie von Lösungen (1:6000—34000) besitzt die Eigenschaften der beiden ersten Kategorieen, wobei jedoch die lokomotionshemmenden Eigenschaften vorwiegen, das sind sozusagen fakultativ bakterizide Titer; 4) die vierte Kategorie endlich (die Lösungen 1:202000—404000) offenbart bei ihrer Einwirkung keinen streng konstanten Charakter.

Man kann nicht umhin, den Umstand zu beachten, daß eine Beschleunigung der Bewegungen am häufigsten in den 1-stündigen Versuchen beobachtet wurde, daß eine solche nur zum geringen Teile bei unseren schwächsten Sublimatlösungen, die sich nicht durch scharf ausgesprochene Einwirkungsart auszeichnen, registriert wurde und daß sie

endlich zum größeren Teile bei den lokomotionshemmenden und fakultativ bakteriziden Titern statthatte, sobald diese nur kurzdauernd einwirkten und noch keine Zeit hatten, die für sie charakteristische Wirkungsart in vollem Maße zu entfalten.

Was nun den Grad der Hemmung der lokomotorischen Funktion anlangt, so ist in dieser Beziehung hervorzuheben, daß die Intensität dieser Depression mit dem Ansteigen der Einwirkungsdauer des Sublimats sowie mit der Verringerung seiner Konzentration sich nur sehr wenig veränderte; sowohl bei 1:46000, wie auch bei 1:101000, sowohl bei $\frac{1}{4}$ -stündiger, als auch 5-stündiger Versuchsdauer äußerte sich der Grad der Hemmung in fast einer und derselben Größe: Die Schnelligkeit nahm fast stets um die Hälfte der Schnelligkeit in den Kontrollversuchen ab. Dasselbe fand auch im allgemeinen bei den absolut und fakultativ bakteriziden Titern statt in denjenigen Fällen, wo sie auf die Bewegung des Typhusbacillus hemmend einwirkten. Im Gegensatz hierzu war bei Sublimatverdünnungen ohne scharf ausgesprochene Wirkungsart der Grad der Depression der lokomotorischen Funktion, dort natürlich, wo eine solche Platz hatte, deutlich geringer als in den Versuchen mit den oben bezeichneten Lösungen: Die Schnelligkeit sank auf $\frac{1}{5}$, $\frac{1}{7}$, ja sogar auf bloß $\frac{1}{9}$ der Schnelligkeit in den Kontrollversuchen.

Nachdem ich derartige völlig eindeutige und überaus klare Resultate mit dem Typhusbacillus erzielt hatte, ging ich zum Studium der Einwirkung des Sublimats auf den Choleravibrio über.

Die Gesamtzahl der Versuche mit dem Choleravibrio¹⁾ betrug 49: die Ergebnisse sind in der Tabelle No. 3 angeführt, aus welcher folgendes

Tabelle No. 3.
Vibrio cholerae asiaticae.

Stunden	Verdünnungen	1:3800		1:4300		1:5000		1:11000		1:101000		1:202000		1:404000	
		absolut	in Proz.	absolut	in Proz.	absolut	in Proz.	absolut	in Proz.	absolut	in Proz.	absolut	in Proz.	absolut	in Proz.
0,25	Abtötung	3	100	1	33,3	—	—	1	33,3	—	—	—	—	—	—
	Beschleunigung	0	0	0	0	—	—	0	0	—	—	—	—	—	—
	Hemmung	0	0	2	66,7	—	—	2	66,7	—	—	—	—	—	—
1,0	Abtötung	3	100	3	100	2	66,7	3	100	0	0	0	0	—	—
	Beschleunigung	0	0	0	0	0	0	0	0	—	—	1	33,3	—	—
	Hemmung	0	0	0	0	1	33,3	0	0	1	—	2	66,7	—	—
2,0	Abtötung	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0	0	—	—
	Beschleunigung	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0	0	—	—
	Hemmung	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	3	100	—	—
3,0	Abtötung	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0	0	0	0
bis	Beschleunigung	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0	0	0	0
3,5	Hemmung	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	12	100	5	33,3

sehr klar erhellt: 1) Bis zu einer Verdünnung von 1:202000 inkl. ergaben bei jeglicher Verdünnung und bei jeder Versuchsdauer sämtliche 100 Proz. der Versuche entweder Abtötung der Bakterien allein, oder Bewegungshemmung allein, oder wiesen endlich teils diesen, teils jenen Effekt auf. 2) Eine Abtötung des Choleravibrio wurde noch durch eine Verdünnung von 1:11000 hervorgerufen, wobei nicht nur dieser, sondern

1) Die Vibrionen stammten aus Samara und aus Moskau.

überhaupt alle bakteriziden Titer bei kurzdauernder Einwirkung nicht selten die Bewegungen hemmten; Verdünnungen von 1:101 000 und darunter führten kein einziges Mal zur Abtötung der Bakterien, sogar bei $3\frac{1}{2}$ -stündiger Einwirkung. 3) Sublimattiter von 1:101 000—202 000 hemmten absolut die lokomotorische Funktion des Choleravibrio, jedoch unter der Bedingung, daß sie länger als 1 Stunde einwirkten; bei kürzerer Versuchsdauer war ihre Wirkungsart keine klar und scharf ausgesprochene. 4) Der einzige Fall von Beschleunigung der Bewegung hatte statt bei einer der schwächsten Sublimatlösungen und bei einer derartigen (1-stündigen) Versuchsdauer, bei der die für die betreffende Lösung charakteristische Wirkungsart eben wegen der Kürze der Einwirkung sich nicht entfalten konnte. 5) Endlich wies die Lösung von 1:404 000 in ihrer Einwirkung auf den Choleravibrio keine charakteristischen Besonderheiten auf, sogar bei einer Einwirkungsdauer von 3— $3\frac{1}{2}$ Stunden.

Demnach war die häufigste und konstanteste Folge der Sublimat-einwirkung in unseren sämtlichen Versuchen wie mit dem Typhusbacillus, so auch mit dem Choleravibrio eine Hemmung ihrer lokomotorischen Funktion, und deshalb ist auch diese Erscheinung als einer der wesentlichsten und hauptsächlichsten Effekte der Einwirkung des bezeichneten Mittels anzusehen, wenigstens in denjenigen Verdünnungen desselben, welche wir anwandten.

Um die gewonnenen Resultate verallgemeinern zu können, führte ich noch eine kleinere Reihe von Versuchen mit einigen anderen beweglichen Bakterien aus: V. Prior-Finkleri, V. Metschnikowi und Bac. pyocyaneus. Die Ergebnisse waren im allgemeinen, wie die Tabelle No. 4 zeigt, die gleichen. Aus dieser Tabelle erhellt, daß der Bac. pyocyaneus im Vergleich mit dem Choleravibrio und dem Typhusbacillus dem Sublimat gegenüber weit widerstandsfähiger ist.

Ganz natürlich drängt sich hier die Frage auf, wie die oben beschriebene Einwirkung des Sublimats aufzufassen ist. Bildet sie das Resultat einer Aktion chemischer Natur, die folglich dem Sublimat als solchem eigentümlich ist, oder hat man es hier mit einer Erscheinung physikalischer Art zu tun? Behufs Lösung dieser Frage nahm ich eine kleinere Reihe ganz gleicher Versuche mit demselben Choleravibrio und demselben Typhusbacillus vor, ersetzte jedoch das Sublimat durch Chlornatrium in einer Menge, die dem spezifischen Gewicht des Sublimats entsprach. Aus der Tabelle No. 5 kann man sich unschwer überzeugen, daß von einer konstanten hemmenden Wirkung seitens des Chlornatriums auf die lokomotorische Funktion der untersuchten Bakterien keine Rede sein kann. Hierzu muß noch hinzugefügt werden, daß hier in den Fällen, wo eine Depression der Beweglichkeit beobachtet wurde, die Intensität dieses Effektes in der Regel eine äußerst geringe war, die Schnelligkeit verringerte sich um $\frac{1}{4}$ — $\frac{1}{11}$ der Schnelligkeit in den Kontrollversuchen. In dieser Beziehung kommt das Kochsalz denjenigen Sublimattitern nahe, welche sich nicht durch eine streng ausgesprochene konstante Wirkungsart auszeichneten. Und eben deshalb liegt kein Grund vor, den Einfluß des Sublimats in der uns hier interessierenden Beziehung als physikalische Erscheinung aufzufassen, hier liegt offenbar eine Einwirkung chemischer Natur vor.

Tabelle
Sub-

Stunden	Verdünnungen	1 : 1080			1 : 1250			1 : 1050			1 : 3020			1 : 3800			1 : 4300		
		Abtötung	Beschleunigung	Hemmung	Abtötung	Beschleunigung	Hemmung	Abtötung	Beschleunigung	Hemmung	Abtötung	Beschleunigung	Hemmung	Abtötung	Beschleunigung	Hemmung	Abtötung	Beschleunigung	Hemmung
0,25	Bac. typhi abdominalis	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	100	0	0	33,3	0	66,7
	V. Cholerae asiaticae	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	V. Prior-Finkleri	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	V. Metschnikowi	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	Bac. pyocyaneus	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
0,5	Bac. typhi abdominalis	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	V. cholerae asiaticae	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	V. Prior-Finkleri	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	V. Metschnikowi	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	Bac. pyocyaneus	100	—	—	—	—	—	0	0	100	—	—	—	—	—	—	—	—	—
1,0	Bac. typhi abdominalis	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	100	0	0	100	0	0
	V. cholerae asiaticae	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	V. Prior-Finkleri	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	V. Metschnikowi	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	Bac. pyocyaneus	—	—	—	100	0	0	0	0	100	—	—	—	—	—	—	33,3	0	66,7
2,0	Bac. typhi abdominalis	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	V. cholerae asiaticae	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	V. Prior-Finkleri	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	V. Metschnikowi	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	Bac. pyocyaneus	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
3,0 und mehr	Bac. typhi abdominalis	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	V. cholerae asiaticae	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	V. Prior-Finkleri	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	V. Metschnikowi	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	Bac. pyocyaneus	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0	0	100	—	—	—	33,3	0	33,3

Tabelle No. 5.

Dauer des Versuchs in Stunden		Bac. typhi abdominalis				Vibrio cholerae asiaticae			
		NaCl in Verdünnungen				NaCl in Verdünnungen			
		1 : 1068		1 : 22 174		1 : 922		1 : 43 913	
		absolut	in Proz.	absolut	in Proz.	absolut	in Proz.	absolut	in Proz.
1,0	Abtötung	0	0	—	—	0	0	—	—
	Beschleunigung	1	33,3	—	—	0	0	—	—
	Hemmung	2	66,7	—	—	2	66,7	—	—
2,0	Abtötung	—	—	—	—	—	—	0	0
	Beschleunigung	—	—	—	—	—	—	3	100
	Hemmung	—	—	—	—	—	—	0	0
3,0	Abtötung	—	—	0	0	—	—	—	—
	Beschleunigung	—	—	0	0	—	—	—	—
	Hemmung	—	—	2	67,7	—	—	—	—
4,0 und darüber	Abtötung	—	—	0	0	—	—	0	0
	Beschleunigung	—	—	0	0	—	—	0	0
	Hemmung	—	—	3	100	—	—	3	100

No. 4.
lim a t.

Acidum carbolicum.

In Tabelle No. 6 sind die allgemeinen Ergebnisse sämtlicher Versuche mit dem Typhusbacillus in Abhängigkeit von Karbolsäurelösungen aller oben erwähnten 4 Kategorieen dargestellt.

Erste Abt. Orig. Bd. L.

Tabelle No. 6.
Bac. typhi abdominalis. Karbolsäure.

Verdünnungen	1:125—200		1:220—300		1:550—5050		1:10050—50050	
Von der Gesamtzahl der Versuche	18		12		24		46	
	absolut	in Proz.	absolut	in Proz.	absolut	in Proz.	absolut	in Proz.
Abtötung der Bakterien	13	67,7	1	8,3	0	0	0	0
Hemmung d. Bewegungen	6	33,3	11	91,7	21	87,5	27	58,7
Beschleunigung der Bewegungen	0	0	0	0	0	0	17	37,0
Schnelligkeit unverändert	0	0	0	0	3	12,5	2	4,3

Fälle von Beschleunigung der Bewegung fanden hier ganz ebenso statt wie beim Sublimat, wurden jedoch, wie die Tabelle zeigt, 17mal beobachtet, d. h. in 17 Proz. aller Versuche, mehr als doppelt so häufig wie bei Sublimat (7,4 Proz.). Dabei ist hervorzuheben, daß die Beschleunigung der Bewegung hier ausschließlich bei den schwächsten Karbolsäurelösungen zur Beobachtung kam.

Ferner zeigt die Tabelle, daß der Prozentsatz der Versuche mit Abtötung der Bakterien, die im ganzen 13 Proz. der Gesamtzahl der Versuche ausmachen, recht groß bei unseren kräftigen Karbolsäurelösungen ist, überaus deutlich bei den auf sie folgenden etwas schwächeren Lösungen absinkt und bei weiteren Verdünnungen gar nicht mehr zu verzeichnen ist.

Am schärfsten jedoch tritt auch in dieser Tabelle die beobachtete Bewegungshemmung zutage; sie war bei unseren sämtlichen Verdünnungen zu verzeichnen, am häufigsten kam sie jedoch bei Karbolsäureverdünnungen

Tabelle
Bac. typhi abdominalis.

Stunden	Verdünnungen	1:125		1:153		1:200		1:220		1:300	
		absolut	in Proz.	absolut	in Proz.	absolut	in Proz.	absolut	in Proz.	absolut	in Proz.
0,5	Abtötung	—	—	—	—	3	37,5	—	—	—	—
	Beschleunigung	—	—	—	—	0	0	—	—	—	—
	Hemmung	—	—	—	—	5	62,5	—	—	—	—
1,0	Abtötung	3	100	2	66,7	—	—	0	0	0	0
	Beschleunigung	0	0	0	0	—	—	0	0	0	0
	Hemmung	0	0	1	33,3	—	—	3	100	3	100
2,0 und darüber	Abtötung	—	—	—	—	2	100	—	—	—	—
	Beschleunigung	—	—	—	—	0	0	—	—	—	—
	Hemmung	—	—	—	—	0	0	—	—	—	—
3,0 und darüber	Abtötung	—	—	—	—	2	100	—	—	1	16,7
	Beschleunigung	—	—	—	—	0	0	—	—	0	0
	Hemmung	—	—	—	—	0	0	—	—	5	83,3
4,0 und darüber	Abtötung	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	Beschleunigung	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	Hemmung	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

Karbolsäure anzusehen, wenigstens in denjenigen Verdünnungen, welche von mir am allerrhäufigsten angewandt wurden.

Die Wechselbeziehungen zwischen den verschiedenen Wirkungsarten der Karbolsäure auf den Typhusbacillus in Abhängigkeit von der Konzentration der Lösung allein tritt am deutlichsten auf dem nebenstehenden Diagramm No. 2 hervor.

Aus der Tabelle No. 7 ist klar ersichtlich, daß bis zu einer Verdünnung von 1:2550 inkl. bei jeglicher Verdünnung und für jede Versuchsdauer sämtliche 100 Proz. der Versuche entweder Abtötung der Bakterien allein, oder Bewegungshemmung allein, oder teils diesen, teils jenen Effekt ergaben. Angefangen von einer Verdünnung von 1:5050 und darunter, gesellte sich zu den früheren Wirkungseffekten der Karbolsäure noch ein neuer hinzu, nämlich Beschleunigung der Bewegungen; diese wurde fast ausschließlich in den Versuchen von 1-stündiger Dauer beobachtet; hier kam somit genau dasselbe Verhalten zur Beobachtung, wie bei den Versuchen mit Sublimat.

Eine Abtötung der Typhusbacillen wurde, wie die Tabelle zeigt, bei Verdünnungen bis zu 1:300 beobachtet, wobei eine kurzdauernde Einwirkung derselben am häufigsten eine Bewegungshemmung zur Folge hatte; die bezeichnete Eigentümlichkeit wird vollkommen deutlich durch eine Reihe von Zahlen aus den Versuchen mit der Verdünnung 1:200 illustriert. Andererseits gingen einige Verdünnungen, die die Eigenschaften absoluter Depression der lokomotorischen Funktion gezeigt hatten, bei der Verlängerung der Einwirkungsdauer dieses ihren absoluten Charakters verlustig und führten mitunter zu einer Abtötung der Bakterien, was durch die Ergebnisse der Versuche mit der Verdünnung 1:300 vorzüglich illustriert wird. Innerhalb der Grenzen der bakteriziden Titer sank überhaupt mit dem Schwächerwerden der Karbolsäurelösungen auch der Prozentsatz der Versuche, wo eine Abtötung der Typhusbacillen stattfand, gleichzeitig damit wurde ein Ansteigen des Prozentsatzes der Versuche, wo eine Bewegungshemmung resultierte, beobachtet, während bei Verdünnungen von 1:220–300 der erstere Effekt durch den letzteren vollkommen verdrängt wurde, was durch eine Reihe von Zahlenangaben aus den Versuchen von 1-stündiger Dauer sehr klar illustriert wird. Karbolsäureverdünnungen von 1:550–5050 übten eine absolute depri-mierende Wirkung auf die lokomotorische Funktion des Typhusbacillus aus; schwächere Lösungen hingegen (1:10050 und darunter) waren in ihrer Wirkungsart nicht streng konstant.

Karbolsäuretitern von 1:550 an führten kein einziges Mal zu einer Abtötung der Bakterien, trotz Verlängerung der Versuchsdauer bis zu 6 Stunden und darüber; dabei entwickelte, wie aus der Tabelle ersichtlich, die in Rede stehende Gruppe von Verdünnungen die für sie charakteristische absolute hemmende Wirkung nur unter der unerläßlichen Bedingung, daß sie nicht weniger als 2 Stunden einwirkten; eine kürzer dauernde Einwirkung ergab jedenfalls keine konstante Bewegungshemmung, was durch die Resultate der Versuche besonders mit der Verdünnung 1:5050 genügend illustriert wird.

Was die Intensität der hemmenden Wirkung der Karbolsäure anlangt, so ist in dieser Beziehung zu sagen, daß sie bei den bakteriziden und lokomotionshemmenden Titern eine recht bedeutende war, bei den Verdünnungen ohne scharf ausgesprochene konstante Wirkungsart hingegen merklich abnahm. Nur bei den Titern dieser letzteren Kategorie

wurde eine Verringerung der Schnelligkeit um $\frac{1}{13}$ — $\frac{1}{14}$ der Schnelligkeit in den Kontrollversuchen angetroffen, während eine Verminderung der Schnelligkeit um die Hälfte der in den Kontrollversuchen, wie sie gerade bei den Verdünnungen der ersten beiden Kategorieen häufig beobachtet wurde, hier äußerst selten statthatte.

Eine völlig analoge Reihe von Versuchen wurde mit dem Cholera-vibrio ausgeführt; die Gesamtzahl meiner Experimente mit vollkommen eindeutigem Resultat beträgt 77. Eine allgemeine Uebersicht der Gesamtergebnisse ist in der Tabelle No. 8 enthalten.

Tabelle No. 8.
Vibrio cholerae asiaticae. Karbolsäure.

Verdünnungen	1:153		1:220—300		1:550—5050		1:10050—50050	
Von der Gesamtzahl der Versuche	6		18		38		15	
	absolut	in Proz.	absolut	in Proz.	absolut	in Proz.	absolut	in Proz.
Abtötung der Bakterien	6	100	13	72,2	0	0	0	0
Hemmung d. Bewegungen	0	0	5	27,8	32	84,2	9	60,0
Beschleunigung der Bewegungen	0	0	0	0	3	7,9	1	6,7
Schnelligkeit unverändert	0	0	0	0	3	7,9	5	33,3

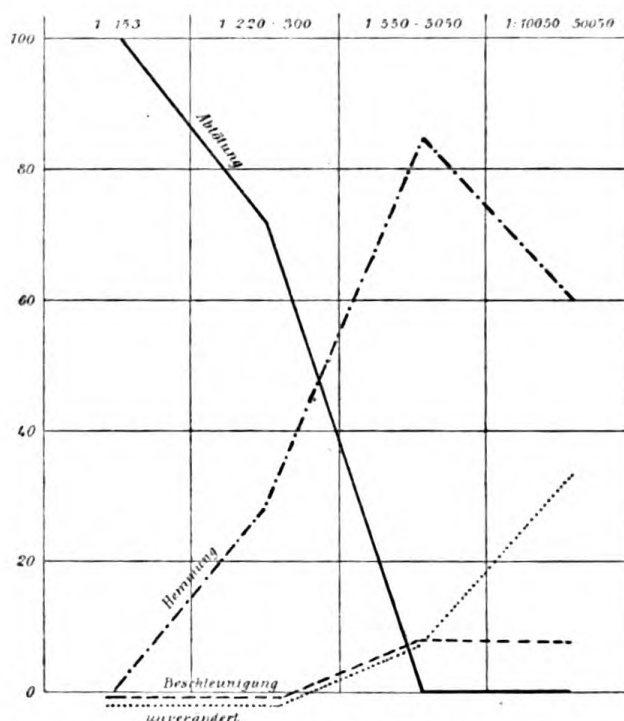
Aus der Tabelle erhellt, daß die Geschwindigkeit gänzlich unverändert geblieben ist, 8mal, d. h. in 10,4 Proz. aller Versuche, doppelt so häufig, als bei den gleichen Versuchen mit dem Typhusbacillus (5 Proz.); dabei nimmt der Prozentsatz der Versuche mit diesem Effekt, wie ersichtlich, mit der Abschwächung des Karbolsäuretiters sehr erheblich zu.

Fälle von Beschleunigung der Bewegung wurden hier im ganzen 4mal beobachtet, d. h. in 5,2 Proz. sämtlicher Versuche, mehr als 3mal so selten, wie bei den gleichen Versuchen mit dem Typhusbacillus (17 Proz.).

Eine Abtötung der Bakterien kam, wie die Tabelle zeigt, bei unseren kräftigen Titern (bis zu 1:300) sehr häufig zur Beobachtung und wurde in 24,7 Proz. der Gesamtzahl der Versuche verzeichnet. Bei weiterer Verdünnung der Karbolsäure wurde ein derartiger Effekt gar nicht mehr beobachtet; innerhalb der Grenzen der bakteriziden Titer sank auch mit der Abschwächung der Konzentration die Häufigkeit der Fälle von Bakterienabtötung.

Unter den verschiedenen Effekten der Karbolsäureeinwirkung nimmt jedoch auch hier ihrer Häufigkeit nach die Bewegungshemmung den ersten Platz ein; sie wurde in 59,7 Proz. der Gesamtzahl der Versuche beobachtet. Die Häufigkeit des Effektes wächst, wie die Tabelle zeigt, mit der Abschwächung der Konzentration, aber nur bis zu einer gewissen Grenze (1:5050); bei weiterer Verdünnung der Karbolsäure wurde die Bewegungshemmung weit seltener verzeichnet.

Die beschriebenen Wechselbeziehungen zwischen den verschiedenen Wirkungsarten der Karbolsäure in Abhängigkeit von der Konzentration der Lösung allein treten am deutlichsten auf dem nebenstehenden Diagramm No. 3 zutage.

Kurve No. 3. Karbolsäure. *Vibrio cholerae asiaticae*.

Aus der Tabelle No. 9 erhellt mit möglichster Deutlichkeit, daß bis zu einer Verdünnung von 1:5050 inkl. bei jeder Verdünnung und für jede Versuchsdauer fast überall sämtliche 100 Proz. der Versuche entweder

Tabelle
V. cholerae asiaticae.

Stunden	Verdünnungen	1:153		1:220		1:300		1:550	
		absolut	in Proz.	absolut	in Proz.	absolut	in Proz.	absolut	in Proz.
0,5	Abtötung	—	—	—	—	0	0	—	—
	Beschleunigung	—	—	—	—	—	—	—	—
	Hemmung	—	—	—	—	1	—	—	—
1,0	Abtötung	6	100	5	83,3	0	0	—	—
	Beschleunigung	0	0	0	0	0	0	—	—
	Hemmung	0	0	1	16,7	3	100	—	—
2,0	Abtötung	—	—	—	—	—	—	—	—
	Beschleunigung	—	—	—	—	—	—	—	—
	Hemmung	—	—	—	—	—	—	—	—
3,0	Abtötung	—	—	—	—	4	100	—	—
	Beschleunigung	—	—	—	—	0	0	—	—
	Hemmung	—	—	—	—	0	0	—	—
4,0	Abtötung	—	—	—	—	—	—	—	—
	Beschleunigung	—	—	—	—	—	—	—	—
	Hemmung	—	—	—	—	—	—	—	—
5—7,5	Abtötung	—	—	—	—	4	100	0	0
	Beschleunigung	—	—	—	—	0	0	0	0
	Hemmung	—	—	—	—	0	0	3	100

Abtötung der Bakterien allein, oder Bewegungshemmung allein, oder teils diesen, teils jenen Effekt ergaben. Angefangen von einer Verdünnung von 1:10050 und darunter, machten die beiden bezeichneten Wirkungsarten zusammengenommen fast niemals 100 Proz. aus; in dieser Versuchskategorie wurden alle möglichen Ausgänge beobachtet außer Bakterienabtötung, das sind Karbolsäurelösungen ohne streng ausgesprochene konstante Wirkungsart. Eine Abtötung des Cholera vibrio wurde, wie aus der Tabelle ersichtlich, durch sämtliche Verdünnungen bis 1:300 inkl. hervorgerufen, dabei hatte eine kurzdauernde Wirkung derselben bloß eine Bewegungshemmung allein zur Folge, was durch die Ergebnisse der Versuche mit der Verdünnung 1:300 aufs deutlichste illustriert wird; dieser letztere Titer, der bei einer Einwirkungsdauer von 3 und mehr Stunden absolut bakterizid war, verwandelte sich in einen absoluten Depressor der lokomotorischen Funktion, sobald die Einwirkungsdauer bis zu 1 Stunde verkürzt wurde. Innerhalb der Grenzen der bakteriziden Titer sank allgemein mit der Steigerung der Verdünnung der Prozentsatz der Abtötung des Cholera vibrio, gleichzeitig damit wuchs der Prozentsatz der Hemmungen an, und bei einer Verdünnung von 1:300 wurde die erstere Wirkungsart von der letzteren sogar vollständig verdrängt; alles dies wird durch eine Reihe von Versuchen von 1-stündiger Dauer sehr demonstrativ illustriert.

Die Verdünnungen 1:550—5050 üben auf die lokomotorische Funktion des Cholera vibrio eine absolut hemmende Wirkung aus, aber unter der unerläßlichen Bedingung, daß sie nicht weniger als 2 Stunden einwirkten; eine kürzer dauernde Einwirkung derselben Verdünnungen wies bereits einen solchen Effekt konstant nicht mehr auf, wie dies aus den Versuchen mit dem Titer 1:2550 erhellt; dieser letztere erwies sich bei 1-stündiger Einwirkung in einer meiner Versuchsreihen als

No. 9

Karbolsäure.

1:1050		1:2550		1:5050		1:10 050		1:16 700		1:50 050	
absolut	in Proz.	absolut	in Proz.	absolut	in Proz.	absolut	in Proz.	absolut	in Proz.	absolut	in Proz.
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0	0
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0	0
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	2	66,7
—	—	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
—	—	0	0	0	0	0	0	0	0	1	33,3
—	—	0	0	6	100	1	—	1	—	1	33,4
—	—	0	0	0	0	—	—	—	—	—	—
—	—	0	0	3	27	—	—	—	—	—	—
—	—	3	100	8	73	—	—	—	—	—	—
0	0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
0	0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
—	—	0	0	0	0	0	0	—	—	—	—
—	—	0	0	0	0	0	0	—	—	—	—
—	—	3	100	7	100	2	66,7	—	—	—	—
—	—	—	—	—	—	—	—	0	0	—	—
—	—	—	—	—	—	—	—	0	0	—	—
—	—	—	—	—	—	—	—	2	66,7	—	—

Tabelle
Karbsäure

Verdünnung	Bakterien	1:10000		1:100000		1:1000000		1:10000000		1:100000000	
		Abtötung	Beschädigung	Abtötung	Beschädigung	Abtötung	Beschädigung	Abtötung	Beschädigung	Abtötung	Beschädigung
1	Bac. typhi abortus	—	—	—	—	—	—	100	0	100	0
	V. cholerae asiatica	—	—	—	—	—	—	—	—	0	0 10
	V. Prior-Finkleri	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	V. Metschnikovi	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	Bac. pyocyaneus	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
2	Bac. typhi abortus	—	—	—	—	—	—	100	0	100	0 10
	V. cholerae asiatica	—	—	—	—	—	—	80.3	1	100	0 10
	V. Prior-Finkleri	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	V. Metschnikovi	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	Bac. pyocyaneus	—	—	—	—	80.3 10.7	1	80.3	10.7	—	—
10000	Bac. typhi abortus	—	—	—	—	—	—	100	0	—	—
1000	V. cholerae asiatica	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
darüber	V. Prior-Finkleri	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	V. Metschnikovi	—	—	—	—	—	—	80.3	1	60.7	—
	Bac. pyocyaneus	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
3000	Bac. typhi abortus	—	—	—	—	—	—	100	0	0	16.7 0 83.3
1000	V. cholerae asiatica	—	—	—	—	—	—	—	—	100	0 0
darüber	V. Prior-Finkleri	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	V. Metschnikovi	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	Bac. pyocyaneus	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
4000	Bac. typhi abortus	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
1000	V. cholerae asiatica	—	—	—	—	—	—	—	—	100	0 0
darüber	V. Prior-Finkleri	—	—	—	—	—	—	—	—	100	0 0
	V. Metschnikovi	—	—	—	—	—	—	—	—	100	0 0
	Bac. pyocyaneus	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

völlig indifferent hinsichtlich der motorischen Funktion des Cholera-vibrio.

Karbsäureverdünnungen von 1:100000 und darunter wiesen in ihren Wirkungen keinerlei Einformigkeit auf und stellten sich andere Titer ohne scharf ausgesprochenen konstanten Charakter heraus.

Was die Intensität der deprimierenden Einwirkung der Karbsäure betrifft, so war sie eine recht bedeutende bei den bakteriziden und lokomotionshemmenden Titern, sank jedoch merklich bei den Verdünnungen ohne streng ausgesprochene konstante Wirkungsart.

Um mit vollem wissenschaftlichen Recht sämtliche mit der Karbsäure gewonnenen Resultate auf die beweglichen Bakterien überhaupt übertragen zu können, hielt ich es für notwendig, die Ergebnisse noch an einigen anderen Formen, wie *Vibr. Prior-Finkleri*, *V. Metschnikovi* und *Bac. pyocyaneus* nachzuprüfen. Ohne in eine detaillierte Darstellung der erzielten Ergebnisse mich einzulassen, will ich bloß hervorheben, daß auch diese ergänzende Versuchsreihe, wie die Tabelle

No. 10 zeigt, Resultate lieferte, die mit den früher besprochenen in allen Einzelheiten übereinstimmen.

Aus der letzten Tabelle ist noch folgendes zu ersehen: 1) Als minimaler absoluter bakterizider Titer für den *Cholera vibrio* und *Bac. pyocyaneus* erwies sich ein und dieselbe Karbolsäureverdünnung (1:153), während für den *Typhus bacillus* eine etwas stärkere Lösung (1:125) als solcher Titer sich herausstellte. 2) Als äußerst hemmender Titer erwies sich für den *Cholera vibrio*, *Typhus bacillus* und *Pyocyaneus* ein und dieselbe Lösung (1:5050); bei weiterer Herabsetzung des Karbolsäuretiters wurde eine Verlangsamung der Bewegungen durchweg bereits weniger als in 100 Proz. der Fälle verzeichnet.

Auf Grund des gesamten analysierten Tatsachenmaterials glaube ich mich im Recht, folgende allgemeine Schlußfolgerungen zu ziehen:

1) In der Wirkung des Sublimats und der Karbolsäure auf die motorische Funktion der Bakterien ist eine auffallende Gleichartigkeit zu konstatieren, deren allgemeiner und hervorstechendster Charakterzug in einer Depression

besteht; ein Unterschied zwischen beiden ist nur darin enthalten, daß das Sublimat in 20—40mal so schwachen Lösungen wirksam ist.

2) Dem Absterben der beweglichen Mikroorganismen geht bei der Einwirkung der genannten Stoffe ein Erlöschen der lokomotorischen Funktion der bakteriellen Zelle voraus.

3) Sublimat und Karbolsäure vermögen unter gewissen Bedingungen diese lokomotorische Funktion der Bakterienzelle zu stimulieren.

Nachdruck verboten.

Vorrichtung zur genauen Abmessung, Mischung und Injektion kleinster Flüssigkeitsmengen.

[Aus dem Untersuchungsamt des Hygienischen Instituts der Universität Freiburg i. B.]

Von Privatdozent Dr. E. Küster.

Mit 4 Textfiguren.

In Bd. XL. Heft 2 dieser Zeitschrift beschrieb ich eine neue Saugvorrichtung für Pipetten, welche eine genaue, rasche und aseptische Abmessung kleinster Flüssigkeitsmengen ermöglichte. Diese Saugvorrichtung wurde auf verschiedenen Laboratorien geprüft und erfuhr im allgemeinen eine günstige Beurteilung (cf.¹⁾).

Gleichwohl gelangte die Saugvorrichtung zunächst nur in einer kleinen Anzahl von Laboratorien zur Einführung; der Grund dafür ist in folgendem zu suchen. Bei dem ersten Modell war der Saugkolben des Apparates auf das genaueste in den Saugzylinder eingeschliffen und doch ergaben sich, wenn der Apparat einige Monate in Gebrauch war, Undichtigkeiten, die sich dadurch dokumentierten, daß eine in die aufgesetzten Pipetten aufgesaugte Flüssigkeitsmenge, auch bei arretiertem Kolben nicht auf der eingestellten Marke stehen blieb, sondern allmählich zurücksank. Hierdurch ist natürlich ein genaues Arbeiten außerordentlich erschwert, da man nur bei sehr raschem Vorgehen Fehler in der Abmessung, die durch das Zurückfallen der Flüssigkeitssäule entstehen, vermeiden kann.

Wer gewöhnt ist, mit Injektionsspritzen zu arbeiten, die einen eingeschliffenen Metallstempel besitzen, und womöglich eine seit Jahren tadellos funktionierende Rekordspritze besitzt, der wird der Behauptung von raschem Undichtwerden eines gut eingeschliffenen Metallkolbens nicht zustimmen wollen, dennoch verhält es sich so; man prüfe die Dichtigkeit einer Spritze mit Metallkolben dadurch, daß man dieselbe durch ein Schlauchstück mit einer $\frac{1}{1000}$ Pipette verbindet und Flüssigkeit, Wasser oder dergleichen, in die Pipette aufsaugt: Man wird die Erfahrung machen, daß der Kolben, welcher für Flüssigkeiten bei Injektionen dicht hält, so

1) Arbeiten aus dem Kgl. Inst. f. exp. Therapie Frankfurt a. M. 1906. Heft 2.

viel Luft noch durchläßt, daß die aufgesaugte Flüssigkeitssäule in der Pipette zurücksinkt.

Eine weitere Veranlassung zu ungünstiger Beurteilung des Saugaufsatzes von seiten einiger Kollegen wurde darin gefunden, daß bei raschem Arbeiten kleine Flüssigkeitsmengen in der aufgesetzten Pipette zurückblieben, die sich nicht mehr auspressen ließen, da der Kolben bereits bis auf den Boden des Saugzylinders herabgeschraubt war. Hier liegt der Fehler nicht an der Einrichtung des Saugaufsatzes, sondern in dem unrichtigen Vorgehen des Experimentators: Wenn eine gewisse Flüssigkeitssäule, die in einer Glasröhre sich befindet, durch komprimierte Luft ausgepreßt werden soll, so muß zwischen Enge der Röhre, Art der auszustößenden Flüssigkeit und Größe der Luftkompression ein bestimmtes Verhältnis bestehen; wird die Luftkompression zu groß, so wird nur der axiale Teil der Flüssigkeit ausgepreßt, die Randpartieen der Flüssigkeitssäule werden durch Reibung, Adhäsion und Kapillarwirkung in der Vorwärtsbewegung gehemmt und fließen erst allmählich aus, vorausgesetzt, daß hinreichend lange komprimierte Luft durch die Glasröhre hindurchgepreßt wird. Bei der Verwendung des Pipettenaufsatzes steht nun nur eine beschränkte Menge komprimierter Luft in dem Kolbenraum zur Verfügung; wird dieses durch rasche Niederstoßen des Kolbens verbraucht und dabei nur der zentrale Teil der in die Pipette aufgesaugten Flüssigkeitsmenge ausgestoßen, so läuft der an der Wand haftende Teil der Flüssigkeit erst allmählich nach, sammelt sich im Endteil der Pipette an und kann nun nicht mehr ausgepreßt werden: Die ganze Messung wird ungenau. Die gleiche Erfahrung kann man ja auch machen, wenn man eine mit Flüssigkeit gefüllte Pipette mit dem Munde rasch ausbläst, nur kann man hier durch nochmaliges Ausblasen die Restflüssigkeit entfernen und Abmessungsfehler vermeiden. Bei Verwendung eines Saugaufsatzes für Pipetten darf man eine durch Uebung leicht festzustellende Geschwindigkeit in der Kolbenbewegung nicht überschreiten, und außerdem tut man gut, vor dem Ansaugen der abzumessenden Flüssigkeit zunächst den Kolben etwas zu heben, in diesem Fall hat man zum Auspressen von nachträglich angesaugter Flüssigkeit ein Plus von komprimierter Luft zur Verfügung und kann die Pipette vollkommen entleeren.

Bei einiger Uebung erfüllt also in dieser Beziehung der Pipetten-saugaufsatz seinen Zweck. Das rasche Undichtwerden der Metallkolben erforderte aber eine Aenderung des ersten Modells. Da ich nun der Sterilisierbarkeit und Haltbarkeit des Kolbenmaterials willen von der Verwendung von Metall nicht abgehen wollte, so wurde folgende Modifikation gewählt, wie sie aus Abbildung Fig. 1 ersichtlich ist. Es wurde wie im 1. Modell wiederum ein eingeschliffener Kolben gewählt, dieser aber auf eine besondere, vielleicht neue Art mit zähem Fett (eingedicktes Maschinenöl, Lanolin. anhydricum) gedichtet: Der Kolben ist von der unteren Stirnfläche her hohlgebohrt. In die den zylindrischen Hohlraum begrenzende Seitenwand des Saugkolbens ist innen ein enges Schraubengewinde eingeschnitten, in dem sich eine Schraube F bewegt, welche durch Ansetzen eines Schraubenziehers von H aus gedreht werden kann. Die Außenfläche des Saugkolbens trägt bei G eine ringsum gehende, auf der Abbildung im Durchschnitt dreieckig erscheinende Rinne, die durch 4 feine, runde Oeffnungen mit dem zylindrischen inneren Raum des Kolbens in Kommunikation steht. Zur Dichtung des Saugkolbens

wird nun der Innenhohlraum mit steifem Fett gefüllt, die Schraube *F* lose aufgesetzt, der Kolben so vorbereitet in den Kolbenzylinder eingeführt und durch Anziehen der Führungsschraube der Gleitrinne *E*

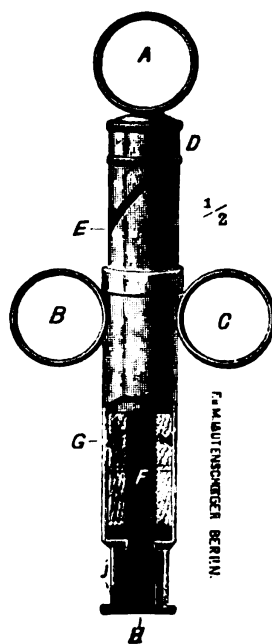


Fig. 1.



Fig. 2.



Fig. 3.



Fig. 4.

(auf der Abb. ist diese kleine Schraube nicht sichtbar) befestigt. Jetzt wird von *H* aus mit Hilfe des Schraubenziehers die Schraube *F* fest angezogen; nach 2—3 Umdrehungen sitzt die Schraube fest, denn das in den Hohlraum eingestrichene Fett wurde durch die vordringende Schraube in die äußere Rinne des Kolbens ausgepreßt, kann von hier.

da der Kolben eingeschliffen ist, nicht weiter, und bildet einen Ring von komprimiertem Fett rings um den Kolben, der bei Bewegung des Kolbens sich mitbewegt und denselben absolut luftdicht macht. Bei längerem Gebrauche geht durch die Bewegung des Kolbens allmählich etwas Fett verloren und der luftdichte Gang ist gestört. In diesem Fall genügt es, die Schraube *F* wieder anzuziehen und sofort ist die Abdichtung wieder hergestellt. Eine Fettfüllung des Kolbens reicht monatelang aus.

Durch die eben beschriebene Fettdichtung des eingeschliffenen Metallkolbens ist in Zukunft ein Versagen des Saugaufsatzes ausgeschlossen. Des weiteren sind noch einige Verbesserungen an dem neuen Modell ¹⁾ angebracht, die das Anwendungsgebiet wesentlich vergrößern. Zunächst faßt der Saugraum nunmehr 5 ccm (früher 1,5), so daß auch Pipetten, welche mehr als 1 ccm halten, verwandt werden können. Das Einsetzen geschieht wie früher durch Gummidichtung und Verschraubung *I*. Es können alle Pipetten verwandt werden, die einen äußeren Durchmesser von 5–6 mm am oberen Ende aufweisen (cf. Abbild. 2). Man kann also die vorhandenen Pipetten weiterbenutzen, wenn man dieselben vom Glasbläser auf dieses Kaliber ausziehen läßt, was nur geringe Kosten verursacht und die sonstige Brauchbarkeit der Pipetten in keiner Weise beeinträchtigt.

Der neue Saugaufsatz ist ferner mit zwei seitlichen Ringen für Daumen und Mittelfinger und einem beweglichen Ring *A* an der Kolbenführungsstange für den Zeigefinger versehen. Hierdurch ist man in der Lage, den Saugaufsatz auch mit einer Hand zu bedienen, doch wird man bei feinen Abmessungen gleichwohl den ganzen Aufsatz mit der linken Hand halten und durch Drehen mit der rechten an der Kolbenführungsstange bei *D* die Bewegung des Kolbens in dem Schraubengang *E* erzielen. Wichtig sind die Ringe bei Verwendung des Saugaufsatzes als Injektionspritze. Zu diesem Zweck wird an Stelle der Pipette eine Spritzenkanüle (Abbild. 3) aufgesetzt. Dieselbe besteht aus Glas, hat $\frac{1}{10}$ ccm-Einteilung und ist am unteren spitzen Ende zum Aufsetzen von Spritzennadeln konisch abgeschliffen. Im Innern der Kanüle befindet sich ein gut eingepaßter Glasschwimmer. Beim Vollsaugen der Spritze wird der ganze Apparat senkrecht gehalten, dadurch wird der Schwimmer von der aufsteigenden Flüssigkeit hochgehoben. Die gefüllte Spritze kann man jetzt für einige Minuten wagerecht legen, der Schwimmer, welcher der Innenwand der Kanüle kapillär anliegt, verhindert, daß Injektionsflüssigkeit bei dieser Lage etwa in den Kolbensaugraum übertritt. Bei der Injektion selbst gestattet die Stellung des Schwimmers eine genaue Ablesung der injizierten Flüssigkeitsmenge und verhindert bei richtiger Handhabung das Mitinjizieren von Luft. Die Kanüle kann durch Durchsaugen von Spülflüssigkeit mit Hilfe der Luftpumpe rasch und leicht gereinigt werden, und da ihr Preis niedrig, kann man eine größere Anzahl in Reagensgläsern trocken sterilisiert aufbewahren. Ein Mitsterilisieren des Saugaufsatzes ist für gewöhnlich nicht nötig, kann aber, ohne denselben zu schädigen, in strömendem Dampf leicht durchgeführt werden.

Will man kleinste Flüssigkeitsmengen ohne Verlust einimpfen, will man z. B. kleinste Blutmengen durch Tierversuch auf ihren Keimgehalt,

¹⁾ Der Saugaufsatz mit verschiedenen Ansätzen wird von F. & M. Lautenschläger, Berlin geliefert.

Wirkung etc. untersuchen, so armiert man den Saugaufsatz mit einer Injektionspipette, wie sie in Abbildung 4 dargestellt ist. Eine Kapillarpipette (0,25 in 250 Teile geteilt), ist an der Spitze zum Aufsetzen einer Injektionsnadel abgeschliffen; am oberen Ende ist eine Mischkugel mit Glasperlen und darüber ein Dreiwegehahn angebracht. Mit dieser Pipette lassen sich Flüssigkeiten bis 0,25 auf 0,001 ccm genau abmessen, in der Mischkugel event. verdünnen und direkt ohne Benutzung einer Spritze etc. (was immer einen Verlust an Substanz bedeutet), injizieren. Der Dreiwegehahn gestattet bei gefüllter Pipette den Kolben des Saugaufsatzes vollends zu heben, so daß bei der Injektion eine möglichst große Kraft zur Verfügung steht, außerdem verhindert er beim Hinlegen des ganzen Apparates, daß Flüssigkeit durch die Mischkugel hindurch in den Saugraum des Kolbens übertritt. Die Injektionspipette kann auch bei Blutkörperchenzählungen als Mischpipette Verwendung finden und ist in Verbindung mit dem Saugaufsatz den üblichen Mischpipetten mit Gummischlauch (zum Ansaugen mit dem Mund), was Raschheit und Exaktheit der Abmessung anbetrifft, weit überlegen.

Ich hoffe, daß der Saugaufsatz für Pipetten in seiner neuen Form sich weiteren Eingang verschaffen wird. Ein Bedürfnis für einen derartigen Hilfsapparat liegt zweifellos vor, das beweist die häufig in der medizinischen Fachpresse wiederkehrende Beschreibung von Vorrichtungen, die dem gleichen Zwecke dienen sollen, an Handlichkeit und Genauigkeit der Abmessung aber einen Vergleich mit der oben beschriebenen Saugvorrichtung nicht aushalten.

Nachdruck verboten

Ueber die Herstellung der Bakteriennährböden aus künstlichen Bouillonpräparaten.

Von Dr. Carl Hart,

Prosektor am Auguste Viktoria-Krankenhaus, Schöneberg-Berlin.

Gelegentlich langer vergleichender Untersuchungen über das Wachstum zahlreicher Mikroorganismen auf verschiedenen Nährböden habe ich eine Erfahrung von so praktischer Bedeutung gemacht, daß ich ihre kurze Mitteilung für berechtigt halte. Die im wesentlichen als Grundlage unserer gebräuchlichen Bakteriennährböden in Betracht kommende Fleischbrühe wird im allgemeinen durch entsprechende Verarbeitung mehr oder weniger hochwertigen Tierfleisches gewonnen, ihre Herstellung ist zeitraubend und, selbst wenn billigeres Fleisch verwertet wird, verhältnismäßig teuer. Deshalb wird auch zur Herstellung der Fleischbrühe vielfach Liebig's Fleischextrakt verwendet. Ich habe nun aus gleichen Erwägungen, namentlich auch, weil die chemischen Analysen so überaus günstig lauten, Maggis Erzeugnisse, und zwar die gekörnte Fleischbrühe wie auch die Bouillonwürfel in die bakteriologische Küche meines Institutes eingeführt und so vorzügliche Erfahrungen gemacht, daß seit nunmehr schon Jahresfrist der große Bedarf an Nährboden ausschließlich aus diesen Erzeugnissen hergestellt wird.

Zur Herstellung der Bouillon verwertet man am besten die gekörnte Fleischbrühe, weil diese am besten zu dosieren ist, und zweckmäßig in etwas schwächerer Konzentration, als die gewöhnliche Küchenvorschrift lautet. Wir verfahren jetzt so, daß wir 10 g gekörnte Fleischbrühe unter Zugabe von 10 g Pepton mit 1 Liter kalten oder auch heißen Wassers übergießen, kurz kochen, bis sich alles gelöst hat, und dann filtrieren. Ein Zusatz von Kochsalz erübrigt sich, weil Maggis gekörnte Fleischbrühe bereits Salzzusatz hat; das Filtrieren ist deshalb nötig, weil sich Fetttropfen auf der Bouillon bilden. Mit der so gewonnenen Bouillon werden alle Nährböden in üblicher Weise hergestellt. Das Bakterienwachstum ist auf allen Maggi-Nährböden ein ausgezeichnetes und, wie besonders auch an sehr vielen Pilzarten festgestellt wurde, ein durchaus typisches. Eine Änderung des biologischen Verhaltens, besonders hinsichtlich der Virulenz, konnte nicht konstatiert werden. Auch ohne Peptonzusatz ist der Nährboden brauchbar, doch sollte er ohne Not nicht wegbleiben. Gonokokken und Meningokokken wuchsen gut bei Zusatz von Ascitesflüssigkeit, Tuberkelbacillen zeigten ein besonders schönes Wachstum mit und ohne Glycerinzusatz zum Nährboden, der nur in seiner Konsistenz weich gehalten sein muß. Dabei habe ich den Eindruck gewonnen, als werde der Nährboden weniger schnell als sonst aufgebraucht.

So glaube ich denn, Maggis Erzeugnisse zur Verwertung in der bakteriologischen Küche angelegentlichst empfehlen zu können. Um prinzipiell Neues handelt es sich ja nicht, aber die Vorteile sind sehr große und wohl jedem in die Augen springende. Die Herstellung der Bouillon ist überaus bequem, sauber, Arbeitskraft und Zeit sparend und last not least billig. Es dürften sich also die in Frage kommenden Maggi-Erzeugnisse besonders für kleine bakteriologische Laboratorien, für Kreisärzte, die kein geschultes Dienerpersonal zur Hand haben, für fliegende Untersuchungsstationen selbst in den Tropen eignen. Bei sauberem Gebrauch sind die Originalpräparate absolut keimfrei und, wie ich aus mehreren Mitteilungen entnehme, auch in den Tropen gut haltbar. Vielleicht bietet sich diesem oder jenem Gelegenheit, Erfahrungen zu sammeln, die gewiß so günstig wie meine eigenen und derer, die auf meinen Vorschlag bereits die Maggi-Erzeugnisse verwerten, ausfallen werden.

Berlin, 4. März 1909.

Inhalt.

- Bocchia, Icilio**, Ueber die desinfizierende Kraft des absoluten Amylalkohols im kochenden und im Dampfzustande, p. 469.
- Fermi, Claudio**, Ueber die Verteilung des Lyssavirus im Nervensystem, p. 438.
- Gabbi, Umberto** und **Caracciolo, Rosario**, Kala-Azar in Sizilien und Kalabrien, p. 424.
- Hart, Carl**, Ueber die Herstellung der Bakteriennährböden aus künstlichen Bouillonkulturen, p. 494.
- Küster, E.**, Vorrichtung zur genauen Abmessung, Mischung und Injektion kleinster Flüssigkeitsmengen, p. 490.
- Kulescha, G. S.**, Ein Fall von Cholera asiatica mit vorherrschender Affektion der Leber und der Gallengänge, p. 417.
- Lischowetski, M.**, Die Einwirkung des Sublimats und der Karbolsäure auf den Typhusbacillus, den Choleravibrio und einige andere bewegliche Bakterien, p. 473.
- v. Linstow**, Neue Helminthen aus Deutsch-Südwest-Afrika, p. 448.
- Livierato, Spiro**, Ueber die Aetiologie des Scharlachs. Biologische Untersuchungen zur Kenntnis desselben, p. 422.
- Müller, Leon**, De l'influence de l'opothérapie thyroïdienne et du traitement iodé sur le pouvoir hémolytique du serum, p. 462.
- Nägler, K.**, Eine neue Spirochäte aus dem Süßwasser, p. 445.
- Pugliese** und **Debenedetti**, Experimentelle Untersuchungen über die Infektionsfähigkeit der Vaccinestoffe, p. 443.
- Raubitschek, Hugo**, Bemerkungen zu dem Artikel von R. Emmerich und O. Löw „Zur Kenntnis der bakteriellen Eigenschaften der Pyocyane“, p. 468.
- Repetto, R.**, Experimentelle und histologische Beobachtungen über die Milch und die Amnionflüssigkeit eines an der Tollwut gestorbenen Schafes, p. 442.
- Rodenwaldt, Ernst**, Fasciolopsis Füllebornii n. sp., p. 451.
- Saul, E.**, Untersuchungen zur Aetiologie und Biologie der Tumoren. IX., p. 427.
- Vallillo, Giovanni**, Das Vorkommen von Ascaris mystax beim Löwen, p. 461.

Die Redaktion des „Centralblatts für Bakteriologie und Parasitenkunde“ richtet an die Herren Mitarbeiter die ergebene Bitte, etwaige Wünsche um Lieferung von besonderen Abdrücken ihrer Aufsätze entweder bei der Einsendung der Abhandlungen an die Redaktion auf das Manuskript schreiben zu wollen oder spätestens nach Empfang der ersten Korrekturabzüge direkt an den Verleger, Herrn Gustav Fischer in Jena, gelangen zu lassen.

Nachdruck verboten.

Ueber einen eigenartigen, paratyphusähnlichen, Gelatine langsam verflüssigenden Bacillus bei einer Furunculosis nach fraglicher Infektion mit Loefflerschem Mäusetyphus.

[Aus der bakteriologischen Abteilung des Hygiene-Institutes Zürich.
(Abteilungsvorstand: Prof. Dr. W. Silberschmidt).]

Von med. pract. H. Gellinger, gew. Assistenten am Institut.

Die in der Literatur mitgeteilten Fälle von Erkrankung des Menschen nach Beschäftigung mit dem Loefflerschen Mäusetyphusbacillus (cf. Fleischanderl)¹⁾ sind noch spärlich und ist die Frage der Infektionsmöglichkeit noch nicht völlig aufgeklärt. Die nachfolgende bakteriologische Untersuchung eines Falles, in dem auch Infektion mit Mäusegift in Frage kam, mag daher sowohl in bakteriologischer als auch in forensischer Beziehung von Interesse sein.

Im Herbst vorigen Jahres übersandte Herr Dr. Schäppi in Zürich dem Hygiene-Institut Zürich Eiter von einer Furunculosis, die angeblich nach dem Streuen von Mäusegift entstanden war. Das Material stammte von einem Furunkel am Kopfe. Da es sich um eine Unfallsache handelte, sollte die Aetiologie bakteriologisch festgestellt werden.

Die Anamnese des Falles, die Herr Dr. Schäppi die Freundlichkeit hatte, uns zur Verfügung zu stellen, wofür ich ihm auch an dieser Stelle meinen verbindlichen Dank ausspreche, ergibt folgendes:

R. B., Arbeiter bei Herrn G., Mühlenbauanstalt, kam am 21. Okt. 1908 in ärztliche Behandlung. Patient litt an einer Furunkulose des rechten Vorderarmes, daneben bestand ein akutes Ekzem der rechten Hand, des rechten Vorderarmes, des Halses und des Gesichtes (namentlich Stirn und Augenlider). Am rechten Daumen, nahe dem Handgelenk, bestand eine in Heilung begriffene, mit einem Schorfe bedeckte, kleine Schürfwunde, die nach Angabe des Patienten der Ort war, wo zuerst Eiterung auftrat. Die weiter nach oben auftretenden Furunkel seien erst später entstanden. Während der Behandlung traten noch mehrere Furunkel auf, mehrere kleine im Bereich der behaarten Kopfhaut und ein größerer auf der Stirn.

Die Furunkel wurden nach Incision mit feuchten Tonerdeverbänden behandelt, das begleitende Ekzem mit Borzinkpaste. Pat. konnte am 9. Nov. 1908 die Arbeit wieder aufnehmen. Der Urin des Pat. zeigte niemals pathologischen Befund.

Die sofortige mikroskopische, kulturelle und experimentelle Untersuchung des zugesandten Eiters ergab folgendes Resultat: Neben dem *Micrococcus pyogenes aureus* wurden gramnegative, roten Farbstoff bildende Stäbchen nachgewiesen, die in ihrem biologischen Verhalten dem *Bacterium prodigiosum* entsprachen, wie vergleichende Untersuchungen mit 2 Laboratoriumsstämmen ergaben. Die Agglutination derselben mit Merckschem Typhus- und Paratyphusserum sowie mit dem Patientenserum verlief negativ. Besonders hervorgehoben sei die ziemlich hohe Tiervirulenz. Meerschweinchen, Ratten und Mäuse, die mit 1 Oese einer 24-stündigen Agarkultur des isolierten *Prodigiosum* teils subkutan, teils intraperitoneal geimpft wurden, gingen innerhalb 8—24 Stunden ein.

1) Fleischanderl, Mitteilungen über einige Krankheitsfälle, hervorgerufen durch Mäusetyphusbacillen. (Münch. med. Wochenschr. 1909. p. 392 und die dortigen Literaturangaben.

Außer diesen beiden Mikroorganismen erhielten wir nun ferner aus den mit dem Eiter angelegten Kulturen ein zweites gramnegatives Stäbchen, welches keinen Farbstoff bildete. Im hängenden Tropfen waren die einzelnen Individuen zum größeren Teil schlecht beweglich, und nur vereinzelte Stäbchen bewegten sich rasch durchs Gesichtsfeld. Färberisch konnten nur wenige peritriche Geißeln nachgewiesen werden. Es wird im folgenden dieses Stäbchen mit „M w“ bezeichnet.

Da die Vermutung, es könnte sich um Loefflersche Mäusetyphusbakterien handeln, nahelag, ersuchten wir Herrn G., uns zum Vergleich eine Probe des zum Auslegen benutzten Materials zukommen zu lassen. Das ursprüngliche Material war vollständig aufgebraucht; Herr G. bezog eine weitere Probe, die er uns übersandte, und die zu den weiteren Versuchen diente.

Zur Feststellung des biologischen Verhaltens von „M w“ wurden erstens Parallelkulturen angelegt mit dieser frisch bezogenen Probe echter Mäusetyphusbakterien und *Bacterium paratyphi* B aus unserer Sammlung, zweitens stellten wir Tierversuche an mit „M w“, und drittens sollten verschiedene Immunitätsreaktionen die Frage entscheiden.

Eigenschaften des paratyphusähnlichen Bacillus „M w“.

I. Kulturen mit „M w“.

Das Ergebnis der vergleichenden kulturellen Untersuchung läßt sich folgendermaßen resumieren: Vor allem muß das übereinstimmende Verhalten des fraglichen Mikroorganismus mit den zwei verglichenen Stämmen Mäusetyphus und Paratyphus B namentlich Erwähnung finden, das gleichartige Aussehen auf den Spezialnährböden Endo, Drigalski-Conradi und Brillantgrünpikrinsäureagar nach Conradi. Besonders interessant ist die Nichtvergärung von Milchzucker, während Traubenzucker deutlich vergoren wurde.

Der markanteste Unterschied wurde in den Gelatinekulturen beobachtet. Erst nach etwa 3 Wochen beginnt „M w“ die Gelatine zu verflüssigen. Zuerst lag Verdacht auf Verunreinigung vor, es wurden daher wiederholt verschiedene Kolonien isoliert und weitergeprüft. Die äußerst langsame Verflüssigung stellte sich regelmäßig ein. Diese Beobachtung beweist, wie wichtig es ist, die Gelatinekulturen längere Zeit zu beobachten.

II. Tierversuche mit „M w“.

In den an Meerschweinchen, Mäusen und Ratten angestellten Versuchen zeigte sich unser Mikroorganismus in erheblichem Grade tierpathogen. Als Impfmateriel kamen 24-stündige Agarkulturen zur Verwendung. Mäuse und 200 g schwere Meerschweinchen starben nach intraperitonealer Injektion einer Oese innerhalb 24 Stunden mit übereinstimmendem Sektionsbefund: Seröser Erguß im Pleuraraum, Peritonitis sero-fibrinosa, etwas vergrößerte Milz, entzündete Nebennieren. Etwas resistenter waren die Ratten; eine intraperitoneale Injektion von einer Oese Reinkultur machte die Tiere krank, doch erholten sie sich wieder; größere Dosen wirkten letal. Das pathologisch-anatomische Bild entsprach dem oben kurz angegebenen. In allen Fällen war „M w“ direkt mikroskopisch und kulturell im Blut und den Organen nachweisbar. — Ein Fütterungsversuch mit „M w“ verlief ebenfalls positiv. Eine 24-stündige Agarkultur wurde in 20 ccm physiologischer Kochsalz-

lösung aufgeschwemmt. Damit getränktes Brot kam zur Verfütterung. Nach 2 $\frac{1}{2}$ Tagen starben die 2 infizierten Mäuse.

III. Immunitätsreaktionen mit „M w“.

a) Agglutination. Es wurde vorerst das Verhalten des Stammes „M w“ bezüglich der Agglutination gegenüber Typhus- und Paratyphusserum geprüft:

Stamm „M w“	1:100	1:500	1:1000	1:5000
Typhusserum	±	—	—	—
Paratyphus B-Serum	+++	++	+	—
Paratyphus A-Serum	+++	+	—	—

Kontrolle: Keine Agglutination. Stäbchen teils unbeweglich, teils ziemlich bis sehr gut beweglich.

+++ = Alle Mikroorganismen in Haufen verklumpt.

++ = Haufen und einzelne unbewegliche Stäbchen.

+ = Haufen und bewegliche Stäbchen.

— = Keine Agglutination.

Um ein stark agglutinierendes Serum zu erhalten, wurden einem Kaninchen vorerst 5 Oesen von einer 24-stündigen 2 $\frac{1}{2}$ Stunden bei 60° gehaltenen „M w“-Agarkultur intravenös gegeben und die Injektion nach 5 und weiteren 7 Tagen mit größeren Dosen (50 Oesen, halbe Agarkultur) wiederholt. 16 Tage nach der ersten Injektion wurde Serum gewonnen (Serum „M w“).

Agglutination mit Serum „M w“ gegen:

Stamm	1:30	1:50	1:100	1:200	1:500	1:1000	1:2000	1:4000
„M w“	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Mäusetyphus	+++	+	+	+	—	—	—	—

Stamm	1:8000	1:16 000	1:32 000	1:64 000	1:128 000
„M w“	+++	++	+	±	—
Mäusetyphus	—	—	—	—	—

Kontrolle „M w“: Keine Agglutination. Gut bewegliche bis unbewegliche Stäbchen.

„ Mäusetyphus: „ „ „ „ „ „ „

Das Ergebnis dieses Versuches zeigt, daß unser „M w“ auch in bezug auf Agglutination ein vom Loeffler'schen Mäusetyphusbakterium verschiedener Mikroorganismus ist.

b) Komplementbindung. Dieses Resultat wurde durch die Komplementbindungsreaktion nach Bordet-Gengou bestätigt:

Das Antigen wurde hergestellt, indem 24-stündige Agarkulturen von „M w“, Mäusetyphus und Paratyphus B in 10 ccm physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmt und 1 Stunde im Wasserbad bei 60° gehalten wurden. Das Immunserum war Serum „M w“ des oben erwähnten Kaninchens, nachdem 1 Woche vor Anstellung der Reaktion noch einmal eine abgetötete Agarkultur „M w“ intravenös gegeben worden war. Das Serum wurde $\frac{1}{2}$ Stunde bei 58° inaktiviert. Das Komplement wurde vom Meerschweinchen gewonnen. Das hämolytische Serum stammte von einem mit Hammelblutkörperchen behandelten Kaninchen und wurde in gleicher Weise inaktiviert.

Nachdem Antigen, Immunserum und Komplement zusammengebracht waren, wobei mit physiologischer Kochsalzlösung je auf 1 ccm ergänzt worden war, wurden die Eprouvetten 1 Stunde in den Brutschrank gestellt. Dann folgte der Zusatz von hämolytischem Serum (0,05) und Hammelblutkörperchen (0,05), wobei wiederum auf je 1 ccm ergänzt wurde mit physiologischer NaCl-Lösung. Dann wurden die Röhrchen während 2 Stunden im Brutschrank gehalten.

Diese Versuchsreihe hat ein ganz eindeutiges Resultat ergeben. Das Serum des mit „M w“ vorbehandelten Kaninchens hat eine sehr starke komplementbindende Wirkung gezeigt, welche bei den verschiedenen Kontrollprüfungen ausblieb.

Der Ausfall dieser beiden mit „M w“-Serum angestellten Immunitätsreaktionen beweist, daß unser „M w“-Stäbchen ein in

Komplementbindungsversuch von „M w“-Serum mit den drei Antigenen:

Menge Serum	„M w“-Antigen	Mäusetyphus-Antigen	Parat. B-Antigen
0,5	0,1 ×	0,1 ⊕	0,1 ⊕
0,1	0,5 ×	0,5 ○	0,5 ○
0,1	0,2 ×	0,2 ○	0,2 ○
0,1	0,1 ×	0,1 ○	0,1 ○
0,1	0,05 ×	0,05 ○	0,05 ○
Kontrollen:			
—	0,5 ○	0,5 ○	0,5 ○
—	0,2 ○	0,2 ○	0,2 ○
—	0,1 ○	0,1 ○	0,1 ○
—	0,05 ○	0,05 ○	0,05 ○
0,05 ○	—	—	—

Serum „M w“ und Blutkörperchen allein: ×.

× = Vollständige Hemmung.

⊕ = Teilweise Hemmung.

○ = Vollständige Hämolyse.

biologischer Hinsicht von der Paratyphus-Mäusetyphus-Gruppe verschiedener Mikroorganismus ist.

Auf Grund der bisherigen Untersuchung war eine Infektion mit dem Mäusetyphusbacillus nicht anzunehmen; der Vollständigkeit halber wurde aber noch mit dem Patientenserum die Agglutination sowohl gegenüber dem gefundenen „M w“ als gegenüber dem echten Loeffler'schen Mäusetyphusstamm geprüft. Es wurde ferner mit den von Merck gelieferten drei Ficker-Diagnostikumpräparaten Typhus, Paratyphus B und Paratyphus A die makroskopische Agglutination ausgeführt. Das Serum des Patienten wurde etwa 6 Wochen nach der Heilung entnommen.

Mikroskopische Agglutination mit Patientenserum:

Stamm	1:20	1:50	1:100	1:200	1:400	1:1000
„M w“ Mäusetyphus	+++	+++	++	+	+	±

Kontrolle „M w“: Keine Agglutination. Gut bewegliche bis unbewegliche Stäbchen.

„ Mäusetyphus: „ „ „ „ „ „

Makroskopische Agglutination mit Patientenserum und „Ficker“-Diagnostikum

	1:50	1:100	Kontrollen: Kein Bodensatz; bleiben gleichmäßig getrübt
Bacterium typhi	—	—	
Bact. paratyphi B	—	—	
Bact. paratyphi A	—	—	

Der Ausfall der Agglutinationsprüfung mit dem Patientenserum, verbunden mit dem Befund der mikroskopischen und kulturellen Untersuchung des zugesandten Eiters, gestattet, dem Bacterium „M w“ in unserem Falle eine ätiologische Bedeutung zuzuschreiben. Dasselbe Serum, das den Stamm „M w“ bis 1:400 deutlich agglutinierte, zeigte gegenüber Mäusetyphus, Paratyphus A und B und Typhus keine Spur von Agglutination.

Der als „M w“ bezeichnete Mikroorganismus hat gewisse verwandtschaftliche Beziehungen zu der Gruppe des Mäusetyphusbacillus und Paratyphus, ließ sich aber durch sein Verhalten in Gelatine (langsame Verflüssigung vom Ende der 3. Woche an) und durch die Immunitätsreaktionen mit Sicherheit von den erwähnten Bakterien unterscheiden.

Den gefundenen Mikroorganismus konnten wir mit den in der Literatur beschriebenen nicht identifizieren. Es sind allerdings¹⁾ Coli-ähnliche, verflüssigende Arten beschrieben worden, allein diese Mikroorganismen verflüssigen viel rascher und zeichnen sich durch eine intensive Gestankbildung aus, die bei unseren Kulturen nicht auffiel.

Der Befund des *Prodigiosus* ist interessant; besonders hervorgehoben sei die ziemlich hohe Tiervirulenz und das negative Verhalten gegen die verschiedenen Immunitätsreaktionen.

Der vorliegende Fall ist geeignet, zu zeigen, wie sorgfältig derartige Untersuchungen ausgeführt werden müssen und wie vorsichtig die Frage der Schädlichkeit des *Mäusetyphusbacillus* für den Menschen beurteilt werden muß.

Nachdruck verboten.

Ueber Befunde von Paratyphusbacillen in Fleischwaren.

[Aus der Kgl. bakteriologischen Untersuchungsanstalt Neunkirchen;
Leiter: Dr. Conradi.]

Von Oberarzt Dr. Rommeler, kommandiert zur Anstalt.

Der *Bacillus paratyphi* B bzw. der *Schweinepestbacillus* spielt bei der Entstehung der menschlichen Fleischvergiftung eine führende Rolle. Früher fand man diesen Mikroorganismus nur bei Erkrankungen der Schlachttiere. Vor einiger Zeit aber erbrachten Uhlenhuth, Hübener, Xylander und Bohtz²⁾ den Nachweis, daß auch im Darmtraktus gesunder Schlachttiere der *Paratyphusbacillus* vorkommen kann. Diese Ergebnisse gaben auch der Lehre von der Entstehung der Fleischvergiftung ein neues Ziel und veranlaßten die Fragestellung, ob, gleichwie bei gesunden Schlachttieren, so auch in normalen Schlachtprodukten der *Paratyphusbacillus* sich vorfindet. In der Tat ist von Hübener³⁾ und Rimpau⁴⁾ und vorher durch Mühlens, Dahm und Fürst⁵⁾ festgestellt worden, daß in unverdorbenen und unschädlichen Fleischwaren der *Bac. paratyphi* B und der *B. enteritidis* Gärtner vorkommt. Hübener untersuchte aus den verschiedensten Bezugsquellen stammende Würste und fand durch direkte Kultur unter 100 Proben 6mal *Paratyphusbacillen*. Das Untersuchungsmaterial ward aus dem Innern der Würste entnommen und unter Benutzung der Löfflerschen Malachitgrünplatte weiterverarbeitet. Die Zahl der aufgefundenen *Paratyphuskeime* war eine beschränkte und ihre Verteilung innerhalb des Materials ganz unregelmäßig. Gesundheitsstörungen stellten sich nach Genuß der infizierten Würste nicht ein. Rimpau fand gelegentlich in einer völlig einwandfreien Leberwurst, deren Genuß keinerlei Schädigungen hervorrief, gleichfalls *Paratyphusbacillen*. Sehr umfangreiche Versuche stellten Mühlens, Dahm und Fürst an. Sie verfütterten 57 Proben von Fleischwaren aller Art (insbesondere Schweine- und Gänsepökelfleisch) an 138 weiße Mäuse, und erhielten bei 70 positive

1) Lehmann u. Neumann, Atlas und Grundriß der Bakterien. 4. Aufl. 1907. p. 347.

2) Arbeit. a. d. Kaiserl. Gesundheitsamt. Bd. XXVII. Heft 3.

3) Deutsche mediz. Wochenschr. 1908. p. 1044.

4) Deutsche mediz. Wochenschr. 1908. p. 1045.

5) Centralbl. f. Bakteriöl. Abt. I. Orig. Bd. XLVIII. 1908. Heft 1.

Ergebnisse, also bei ca. 50 Proz. der Versuchstiere. Unter den 57 verfütterten Proben von Fleischwaren wurde bei 24 der *B. paratyphi* B. bei 13 der *B. enteritidis* Gärtner festgestellt. Hingegen gelang es den Autoren nicht, unmittelbar aus den Fleischwaren Paratyphusbacillen zu isolieren. Weder führten Vorkulturen in Bouillonröhrchen, noch Anreicherungen der Fleischwaren zum Ziel. Endlich wiesen Uhlenhuth und Schern¹⁾ in Schabefleisch, das 3 Tage auf Eis aufbewahrt war, 2mal Gärtner-Bacillen gleichfalls durch Mäuseverfütterung nach. Die mit dem gleichen Fleisch vom 1. und 2. Tage gefütterten Mäuse blieben gesund. Bemerkenswerterweise mißlang auch hier der kulturelle Nachweis von Gärtner-Bacillen im Schabefleisch. Die bereits erwähnten Fütterungsversuche von Mühlens, Dahm und Fürst, die eine fast ubiquitäre Verbreitung der Fleischvergiftungsbakterien annehmen ließen, wurden nun kürzlich von Holth²⁾ nachgeprüft. Bei Verfütterung von 18 verschiedenen Fleischproben (insbesondere Schinken und Gänsebrust) an 54 weiße Mäuse gelang es nicht, den Nachweis von Paratyphus- oder Gärtner-Bacillen zu erbringen. Diese Befunde stehen also in völligem Widerspruch zu den Beobachtungen von Mühlens, Dahm und Fürst, die ja eine ganz außerordentliche Verbreitung der Fleischvergiftungsbakterien in den Fleischwaren des Handels ergeben hatten. Bei dem Widerstreit der Meinungen hätte es nahe gelegen, die Fütterungsversuche zwecks endgültiger Klärung nochmals zu wiederholen. Allein es tauchten Zweifel auf³⁾, ob überhaupt diese Methodik die vorliegende Frage einwandfrei entscheiden kann, denn, wie sich Mühlens und seine Mitarbeiter bei Kontrollversuchen überzeugt haben, entstehen bei Mäusen, allerdings selten, Spontaninfektionen mit Paratyphus- und Gärtner-Bacillen. Nun teilt ferner Holth am angeführten Orte mit, daß bei ausschließlicher Fleischfütterung weiße Mäuse binnen 8 Tagen sterben. Es ist daher stets der Einwand möglich, daß etwaige im Darm normaler Mäuse vorkommende Paratyphuskeime infolge Schädigung der Darm-schleimhaut durch die tagelange Fleischfütterung, wie nach einem Trauma, mobilisiert und in die Zirkulation gebracht werden. Unentschieden bleibt es dann aber, ob die nach Verabreichung des Fleisches bei Mäusen aufgefundenen Paratyphuskeime den verfütterten Fleischproben oder dem Körper des Versuchstieres entstammen. Auf Grund dieser Erwägungen erschien es geboten, den Tierversuch gänzlich auszuschalten. Danach stand nur die Möglichkeit des kulturellen Nachweises offen. Die früheren Versuche von Hübener und Rimpau hatten bereits das Vorkommen von Paratyphusbacillen in Fleischwaren vollkommen sichergestellt. Ungeklärt war also nur noch die Frage, in welcher Häufigkeit der Paratyphusbacillus in Fleischwaren sich vorfindet. Es galt also, das Nachweisverfahren möglichst zu verfeinern, damit auch spärliche Paratyphuskeime in den Fleischwaren unserer Aufmerksamkeit nicht entgingen. Nach mancherlei Vorversuchen erwies sich folgendes Anreicherungsverfahren als zweckmäßig. Zur Wurst- oder Fleischprobe werden in einer Petri-schale reichlich sterile physiologische Kochsalzlösung, sowie einige Messerspitzen von Succus caricae Papayae sicc. (Merck) hinzugefügt. Vor dem Zusatz sterilisiert man den in dünner Schicht in einer Petri-Schale ausgebreiteten Succus caricae Papayae bei einer Temperatur von 130° im Trockenschrank. Die Wurst- oder Fleischprobe bleibt alsdann 2 Tage

1) Vgl. Uhlenhuth und Hübener, Mediz. Klinik. 1903. No. 48.

2) Centralbl. f. Bakteriologie. etc. Abt. I. Orig. Bd. XLIX. 1909. Heft 5.

3) Vgl. auch Uhlenhuth und Hübener, Mediz. Klinik. 1903. No. 48.

bei 37°. Nach diesem Zeitpunkt ist eine mehr oder weniger intensive Verdauung und Verflüssigung der Proben eingetreten. Von der Verdauungsflüssigkeit werden hierauf einige Tropfen auf je eine Drigalski-Conradische Platte bzw. eine Brillantgrün-Pikrinsäureplatte übertragen und in der üblichen Weise weiterverarbeitet. Auf diese Weise gelang es, unter 50 Proben von Leberwurst, Schlackwurst, Blutwurst und Schwartenmagen 8mal, also in 16 Proz. der Proben, Paratyphusbacillen aufzufinden. Ferner wurde in 8 Proben von Hackfleisch, das aus verschiedenen Läden bezogen worden war, 5mal der Befund von Paratyphusbacillen erhoben. Die Zahl der Paratyphuskeime war meistens bei den Fleisch- und Wurstproben infolge der vorausgegangenen Anreicherung eine recht erhebliche. Nebenher sei bemerkt, daß aus einigen Wurstproben auch der Kartoffelbacillus gezüchtet werden konnte, eine Tatsache, die auf einen Mehlzusatz hindeutet und in forensischer Beziehung Interesse erregen dürfte. Besondere Hervorhebung verdient weiter die Beobachtung, daß unter den 50 Wurstproben bei sofortiger Entnahme aus dem Innern der Würste in keinem Falle der Nachweis von Paratyphuskeimen gelang. Nach eintägiger Pepsinverdauung wurden unter den 50 Wurstproben nur einmal Paratyphuskeime in geringer Menge festgestellt. Bei den Hackfleischproben endlich war sowohl die sofortige Verarbeitung als auch die eintägige Pepsinverdauung ergebnislos verlaufen. Vergleichen wir hiermit die bereits mitgeteilten Beobachtungen von Hübener, wonach die Anzahl der bei direkter Untersuchung der Wurstproben nachgewiesenen Paratyphuskeime eine geringe und ungleichmäßige war, so ergibt sich, daß erst die vorausgegangene mehrtägige Anreicherung der Fleisch- und Wurstproben imstande ist, ein zutreffendes Bild von der Häufigkeit des Vorkommens der Paratyphuskeime in Fleischwaren zu liefern. Des weiteren sprechen die von uns erhobenen Befunde dafür, daß die Menge der in Fleischwaren sich vorfindenden Paratyphuskeime eine recht geringe ist; ja wir müssen sogar annehmen, daß ihre Anzahl in keiner Weise ausreicht, irgendwelche Gesundheitsstörungen, geschweige denn eine Fleisch- oder Wurstvergiftung hervorzurufen, wenn die Würste im frischen Zustand genossen werden. Bei längerer Aufbewahrung ist indes, zumal während der heißen Jahreszeit, zu befürchten, daß unter natürlichen Verhältnissen die gleiche Anreicherung von Paratyphuskeimen stattfindet, die wir in vitro beobachtet haben.

Nachdruck verboten.

Ueber die Verbreitung der Influenzabacillen.

Eine epidemologische Studie.

[Aus dem Kgl. Hygienischen Institut der Universität Königsberg i. Pr.
(Direktor: Geh. Medizinalrat Prof. Dr. R. Pfeiffer).]

Von Privatdozent Dr. R. Scheller, Abteilungsleiter am Hygien. Institut.

Die wichtige Entdeckung des Influenzabacillus durch R. Pfeiffer im Jahre 1892 veranlaßte bald eine Reihe von Arbeiten, welche sich mit der Aetiologie der Influenza beschäftigten. Fast sämtliche Autoren, welche noch während der Höhe der Epidemie dieses Thema in Angriff genommen hatten, konnten Pfeiffers Resultate vollkommen bestätigen, indem sie bei der Influenza konstant Influenzabacillen nachweisen konnten.

Erst späterhin dagegen, als die Influenza bereits bei uns langsam im Abklingen begriffen war, wurden Beobachtungen mitgeteilt, welche einige Verwirrung in das feste Gefüge der Influenzaforschung zu bringen schienen. So wurden häufiger Grippenepidemien beschrieben, wo die Influenzabacillen entweder fehlten oder nur zum geringsten Teile sich nachweisen ließen. Auch wurden direkt als Erreger derartiger Grippeepidemien andere Mikroorganismen namhaft gemacht, so daß einige Autoren, wie z. B. Saquépée, schließlich daran zweifeln, ob es überhaupt eine spezifische Aetiologie der Grippe gäbe.

Andererseits häuften sich Beobachtungen von Influenzabacillen oder Bacillen, welche dem Influenzabacillus nahestehen, bei Personen, die weder zur Zeit der Untersuchung influenzakrank waren, noch vorher influenzakrank gewesen sein sollen, so z. B. bei Scharlach-, Masern-, Keuchhusten-Patienten etc.

Als etwas ganz Besonderes wurde das Verweilen der Influenzabacillen bei Lungenkranken in epidemiefreien Zeiten registriert; ferner wurden von etlichen Autoren Befunde von Influenzabacillen in Abscessen, bei Cystitiden etc. beschrieben, und als ein Beweis für ein saprophytisches Vorkommen von Influenzabacillen gedeutet.

Einige Autoren, z. B. M. Neisser, sind auf Grund der Influenzabacillenbefunde bei nicht Influenzakranken so weit gegangen, den Influenzabacillus gewissermaßen für ubiquitär zu erklären, und ihm jede diagnostische Bedeutung abzusprechen (z. B. Ebstein).

Es sei gestattet, da viele dieser Angaben in der Form, wie sie mitgeteilt wurden, einigermaßen verwirrend wirken können, hierzu einiges zu bemerken. Es war schon R. Pfeiffer bekannt, daß die Krankheitsformen, welche unter dem Symptomenkomplex der Grippe verlaufen, vom ätiologischen Standpunkte aus keineswegs als eine Einheit aufzufassen sind. So hat R. Pfeiffer selbst den *Micrococcus catarhalis* als Erreger grippearter Erkrankungen entdeckt und beschrieben. Wir wissen ferner, daß grambeständige Diplokokken, die wir zunächst von Pneumokokken nicht unterscheiden können, und sogar die Meningokokken katarrhalische Entzündungen der Respirationsschleimhäute hervorrufen, welche klinisch der typischen Influenza sehr ähnlich verlaufen und in epidemischer Verbreitung auftreten können.

Derartige Tatsachen haben aber für den Bakteriologen, wenn er die epidemiologischen Forschungen der letzten Jahrzehnte berücksichtigt, nichts Auffälliges.

Ganz ähnlich wie bei der Influenza liegen die Dinge bekanntlich bei der Cholera; wir haben hier ätiologisch die asiatische, durch den Kochschen *Vibrio* erzeugte, asiatische Cholera zu trennen von den einheimischen Formen, für welche als Erreger sehr verschiedenartige Mikroorganismen, wie die Enteritis-, Paratyphus B-Bacillen und eventuell noch Streptokokken usw. in Betracht kommen. Also auch hier entspricht einem scheinbar einheitlichen klinischen Bilde eine ätiologische Vielheit. Weitere Beispiele sind der Typhus abdominalis, der vom bakteriologischen Standpunkte aus in Typhus- und Paratyphusinfektionen zerfällt, ferner die verschiedenen Formen der Lungenentzündung sowie der Angina.

Derartige Beispiele geben uns das richtige Verständnis für die Verhältnisse bei der Influenza. Die pandemische Influenza, welche auf den Influenzabacillus zurückzuführen ist, ist als Krankheit für sich von den endemischen Grippenformen, für welche andere bereits oben erwähnte Erreger in Betracht kommen, scharf zu trennen.

Ziehen wir nochmals das Beispiel der Cholera heran, so sehen wir,

daß zur Zeit einer Choleraepidemie ebenso wie zu cholerafreien Zeiten auch Fälle von Cholera nostras beobachtet werden können, die klinisch unter dem Bilde der Cholera asiatica verlaufen, ätiologisch aber durch das Fehlen des Cholera vibrio sich scharf von der Cholera asiatica abtrennen. Auf der Höhe einer echten Choleraepidemie werden neben den zahlreichen Cholera asiatica-Erkrankungen mit typischen Cholera vibrien befunden jene Fälle von Cholera nostras in Hintergrund treten resp. fast verschwinden. Man wird daher zu solchen Zeiten unter der großen Zahl der Erkrankungen, die unter dem Symptomenkomplex der Cholera verlaufen, so gut wie ausschließlich Cholera vibrien nachweisen, und nur in vereinzelten Fällen werden sich andere Erreger finden. Klingt die Epidemie ab, so treten jene Cholera nostras-Fälle gegenüber der kleiner werdenden Zahl von Cholerafällen verhältnismäßig immer mehr in den Vordergrund, bis endlich nach Erlöschen der Cholera asiatica bei allen choleraartigen Fällen Cholera vibrien fehlen, wohl aber hingegen ausschließlich Erreger gefunden werden, die für die einheimische Form von ätiologischer Bedeutung sind. Diese Befunde stehen im Einklange mit den epidemiologischen Erfahrungen über Cholera asiatica, und es wird wohl niemand geben, der daraus einen Einwand gegen die Spezifität der Cholera vibrien herleiten wollte.

Analoge Verhältnisse finden wir bei der Influenza. Auf der Höhe der Pandemie können wohl immer nebenher Fälle einheimischer Grippe konstatiert werden, wenn sie auch gegenüber der Pandemie zunächst an Zahl sehr gering sind und nur allmählich mit dem Abklingen der echten Influenza mehr und mehr hervortreten werden. Es wird sich dies dadurch manifestieren müssen, daß, während auf der Höhe der Influenzapandemie der Influenzabacillenbefund vorherrscht, beim Abklingen der Influenzapandemie die Influenzabacillen immer seltener sich nachweisen lassen, während gleichzeitig andere Katarrherreger das Feld beherrschen. Mit diesen aprioristischen Ueberlegungen stehen nun die tatsächlichen Befunde in bester Harmonie, und bilden dadurch einen schönen Beweis für die spezifische Bedeutung des Influenzabacillus.

Ferner haben einige Kritiker des Influenzabacillus einen Punkt unberücksichtigt gelassen, dessen Bedeutung wir ebenso wie bei anderen Infektionskrankheiten auch bei der Influenza nicht übersehen dürfen. So sind wir durch das Studium des Typhus, der Diphtherie, der Ruhr und anderer Infektionskrankheiten mit dem Vorkommen leichter und „symptomloser“ Erkrankungsformen vertraut, bei welchen wir aber oft in demselben Maße, wie bei den schwersten Erkrankungen die spezifischen Erreger finden können. Hierdurch erklären sich wohl manche Befunde, bei welchen in den Lungen oder in anderen Organen angeblich ohne klinisch ausgesprochene Influenzaerkrankung Influenzabacillen gefunden worden sind. Hierher dürften z. B. die Fälle Klienebergers gehören (Influenzabacillen bei Cystitiden). In dem einen von Klieneberger mitgeteilten Falle ergibt ja direkt die Anamnese eine vorausgegangene Influenza, so daß das Auftreten der Pfeifferschen Bacillen in der Harnblase als eine abnorme Lokalisation der Krankheitserreger aufzufassen ist.

Auch muß man, wenn man Influenzabacillenbefunde in influenzafreien Zeiten richtig deuten will, berücksichtigen, daß schon R. Pfeiffer auf die Existenz einer chronischen Influenza hingewiesen hat, was durch Leichtenstern bald bestätigt wurde. Durch R. Pfeiffer sowie durch zahlreiche andere Autoren ist festgestellt worden, daß namentlich Tuberkulose im Anschluß an eine Influenza jahrelang in ihren Lungen

die Pfeifferschen Bacillen beherbergen können. Wenn wir daher bei solchen Individuen in epidemiefreien Zeiten Influenzabacillen finden, so ist daraus ein Beweis gegen ihre ätiologische Bedeutung nicht herzuleiten.

Was das Vorkommen der Influenzabacillen bei Masern- und Scharlachkranken etc. anlangt, so rühren die ersten Beobachtungen ebenfalls von R. Pfeiffer und Beck her. Es liegt die Auffassung nahe, daß diese Kranken besonders für Influenza disponiert sind und eben deshalb während des Herrschens einer Influenzaepidemie so häufig Influenzamischinfektionen akquirieren. Damit stimmt überein, was z. B. bei Masern konstatiert wurde, daß in influenzafreien Zeiten derartige Befunde bedeutend seltener gemacht werden können.

Erschwert wird die Deutung mancher Beobachtungen durch die folgenden Tatsachen.

Schon R. Pfeiffer sah sich durch morphologische Unterschiede veranlaßt, gewisse Stämme von hämoglobinophilen Bacillen, die sich durch größeres Ausmaß der Individuen und eine ausgesprochene Neigung zu Scheinfädenbildung von den typischen Influenzabacillen unterscheiden, als eine besondere Species unter dem Namen der Pseudoinfluenzabacillen zu beschreiben. Wenn es auch jetzt zweifelhaft erscheinen könnte, ob diese Trennung noch aufrecht zu erhalten ist, so wissen wir doch andererseits, daß mindestens zwei streng hämoglobinophile Bakterien-species für den Menschen pathogene Bedeutung haben, die Pfeifferschen und die Koch-Weekschen Bacillen. Des weiteren hat Friedberger im Praeputium des Hundes hämoglobinophile Bakterien beschrieben, die doch sicher als von den Influenzaerregern verschieden aufzufassen sind. Wir finden also — und auch das ist für den Bakteriologen nichts Ueberaschendes — eine ganze Gruppe von Bakterien-species, die nahe verwandt sind, und deren charakteristische Familieneigentümlichkeit die Hämoglobinophilie ist. Unter der Berücksichtigung dieser Verhältnisse wird abzuwarten sein, ob nicht neben den echten Influenzabacillen andere davon bisher nicht sicher abtrennbare Species für die menschliche Pathologie eine, wenn auch bescheidene, Rolle spielen.

Schließlich haben wir mit der Tatsache zu rechnen, daß, wie beim Typhus, bei der Diphtherie und der Cholera, so auch bei der Influenza Personen, die in der Umgebung der betreffenden Kranken sich befinden, obzwar sie selbst gesund bleiben, dennoch in einer großen Prozentzahl die spezifischen Krankheitserreger akquirieren und verbreiten können. Solche Befunde haben besonders zu der Auffassung einer Art von Ubiquität der Influenzabacillen geführt. Ob tatsächlich eine solche Ubiquität besteht, muß sich entscheiden lassen durch Untersuchungen über das Vorkommen von Influenzabacillen bei möglichst zahlreichen Individuen sowohl während des Bestehens einer Influenzaepidemie als auch in influenzafreien Zeiten. Sind die Influenzabacillen ubiquitäre Saprophyten, so muß das Prozentverhältnis der positiven Befunde ganz unabhängig sein von der Zu- und Abnahme der Influenzaepidemie. Sind sie aber die Erreger der Seuche, so muß sich ergeben, daß die während der Akme der Epidemie beträchtliche Zahl von Bacillenträgern mit dem Erlöschen der Epidemie immer mehr und mehr sinkt, und sich dem Nullpunkte nähert. Von diesem Gesichtspunkte aus dürften Untersuchungen, die ich in größerem Umfange in Königsberg während der Influenzaepidemie des Winters 1906/07 sowie in den darauffolgenden, relativ influenzafreien Jahren an Influenzakranken, -Leichen sowie an Gesunden angestellt habe — im ganzen über 800 Untersuchungen —, ein gewisses Interesse darbieten.

Tabelle,

Influenzabacillenbefunde, die gelegentlich einer Influenzaepidemie im Winter 1906/07, im Winter 1907/08, sowie nach Erlöschen der Epidemie im Sommer 1908 sowie Winter 1908/09 erhoben worden sind.

I. Winter 1906/07. (Höhe der Epidemie.)

56 Sputa mit klinischer Influenzadiagnose zeigten	50mal I.B., d. i. 80 Proz., darunter 26mal I.B.-Reinkultur, 20mal I.B. + Diplococc. lanceol. + Micrococcus catarrh. 4mal I.B. + Streptokokken + Di- plococcus lanceolatus.
8 Sputa von Influenzakranken, bei denen fälschlich Tuberkulose diagnostiziert war,	„ 8mal I.B.-Reinkultur, keine Tb.
4 Lungen (Influenzapneumonie)	„ 4mal I.B.-Reinkultur,
29 Tuberkulosesputa	„ 10mal I.B. (ca. 33 Proz.), Bacillen- träger,
109 nicht Influenzakranke (Rachen- mandelausstr.)	„ 25mal I.B. (ca. 24 Proz., Ba- cillenträger, { darunter 20 anamnestisch früher Influenza zeigten 15mal I.B. (ca. 75 Proz.). und 89 „ keine „ 10mal I.B. (ca. 11 „).

II. Winter 1907/08. (Epidemie weniger verbreitet.)

20 Sputa mit klin. Diagn. Influenza zeigten	4mal I.B.-Reinkultur (20 Proz.).
2 Sputa von Influenzakranken, bei denen fälschlich Tuberkulose diagnostiziert war,	„ 2mal I.B.-Reinkultur
105 Tuberkulosesputa	„ 10mal I.B. (ca. 10 Proz. Bacillenträger)
113 Rachenmandel-Ausstriche bei nicht Influenzakranken	„ 15mal I.B. (ca. 13 Proz. Ba- cillenträger) { davon 15 Influenza anamnestisch gehabt, zeigten 7mal I.B. (ca. 50 Proz.). und 98 anamnestisch keine Influenza „ 8mal I.B. (ca. 8 Proz.)

III. Sommer 1908. (Influenza bereits erloschen.)

10 Grippensputa	zeigten 0mal I.B., 10mal Pneumokokken
90 Tuberkulosesputa	„ 3mal I.B. (3,3 Proz. Bacillenträger)
65 Rachenmandelausstr. bei nicht Influenzakranken	„ 1mal I.B. (ca. 1½ Proz.)

IV. Winter 1908/09.

24 Grippensputa	zeigten 0mal I.B., 24mal Pneumokokken
90 Tuberkulosesputa	„ 0mal I.B.
95 Rachenmandelausstr. bei nicht Influenzakranken	„ 0mal I.B.

Das Ergebnis der Untersuchungen¹⁾ ist aus vorhergehender Tabelle ersichtlich. Wir sehen, daß im Winter 1906/07 zunächst ca. 90 Proz. sämtlicher unter der klinischen Diagnose Influenza eingesandten Sputa Influenzabacillen aufweisen. Die Sputa zeigten mit Ausnahme der 6 negativen Sputa fast durchgehend die bereits von Pfeiffer näher beschriebenen Charakteristika. Sie waren stark mucinös, eitrig, von grünlich-gelbem Aussehen und einer gleichmäßigen Konsistenz. Bemerken möchte ich, daß sowohl in diesen sowie in den übrigen in dieser Arbeit angeführten Untersuchungen der Nachweis der Influenza mikroskopisch und kulturell vorgenommen worden ist. In 26 von diesen 50 positiven Auswürfen konnte ich nach Waschen des Auswurfes Influenzabacillen in Reinkultur ohne gleichzeitige Anwesenheit anderer Mikroorganismen nachweisen. In 20 Fällen waren die mehr oder minder zahlreichen Influenzabacillen gleichzeitig von Pneumokokken und Micrococcus

1) Zu besonderem Danke bin ich den Herren Professoren Henke, Hilbert, Krückmann, Lexer, Stenger, A. Stieda verpflichtet, welche in lebenswürdigster Weise mir reichliches Untersuchungsmaterial zur Verfügung gestellt haben.

catarrhalis begleitet. 4mal konnte ich Influenza bei gleichzeitiger Anwesenheit von Strepto- und Pneumokokken konstatieren. Zu diesen 56 Untersuchungen kommen noch jene 8 Auswurfsuntersuchungen hinzu, bei denen es sich, obzwar anfangs seitens der behandelnden Aerzte die Diagnose Tuberkulose gestellt worden war, um echte Influenza gehandelt hat. Statt Tuberkelbacillen wurden in diesen 8 Fällen Influenzabacillen in Reinkultur nachgewiesen. Derartige Verwechselungen von Influenza mit Tuberkulose sind auch in früheren Epidemien oft genug vorgekommen. Ich möchte bereits hier an der Hand der eben erwähnten Befunde darauf hinweisen, daß wir also in fast allen Fällen von Influenza Influenzabacillen nachweisen können, daß hingegen die Angaben mancher Autoren, daß man auch bei echter Influenza den *Micrococcus catarrhalis* regelmäßiger und öfter fände als die Influenzabacillen selbst, von mir nicht bestätigt werden konnte. In unseren Fällen können wir dem *Micrococcus catarrhalis* höchstens die Rolle eines Mischinfektionserregers zuschreiben, wenn wir nicht annehmen wollen, daß sein Vorhandensein in dem Sputum in diesen Fällen nur durch Beimengungen aus den oberen Luftwegen bedingt war. Ich möchte auch noch auf die Untersuchungen zu sprechen kommen, die ich bei 4 zum Exitus gekommenen Influenzapneumonien anstellen konnte.

Bei allen diesen Lungenbefunden zeigte sich ein Bild, wie es R. Pfeiffer als für Influenza typisch beschrieben hat. Ich möchte hier R. Pfeiffers Beschreibung, die so ziemlich alles, was man sagen kann, erschöpft, wiedergeben:

„Schon grobanatomisch findet man in derartigen Leichen sehr auffällige Veränderungen, die hauptsächlich in den Lungen lokalisiert sind. Die letzteren zeigen sich in größerer oder geringerer Ausdehnung pneumonisch infiltriert. Diese Influenzapneumonie ist schon für das bloße Auge deutlich verschieden von der gleichmäßigen lobären Hepatisation der croupösen Pneumonie. Unschwer erkennt man, daß sie sich zusammensetzt aus einer ganzen Anzahl lobulärer Herde, die entweder durch lufthaltiges Gewebe getrennt bleiben, oder auch wenigstens teilweise miteinander verschmelzen. So entstehen sekundär anscheinend lobäre Infiltrate, an denen man doch bei genauem Zusehen den so charakteristischen Aufbau aus getrennten Lobulärpneumonien immer noch erkennen kann. Trotzdem mögen häufig genug Verwechselungen mit croupösen Lungenentzündungen vorgekommen sein. An den einzelnen lobulären Herden sieht man des öfteren noch eine weitere Struktur. In ihrem Zentrum heben sich kleine, stecknadelkopfgroße bis höchstens erbsengroße Partien durch eine graugelbliche Färbung von dem sie umgebenden dunkelroten Gewebe deutlich ab. Bei Druck auf die erkrankten Lungen ergießt sich aus den durchschnittenen Bronchien oder auch mitten aus dem infiltrierten Gewebe tropfenweise ein grüngelblicher, dicker, sehr zäher Eiter, der sofort an das Sputum der Influenzakranken erinnert. Um nun über die Infektionserreger ins klare zu kommen, muß man die Untersuchung über den ganzen Bronchialbaum, vom Kehlkopf anfangend bis hinab in die Alveolen, ausdehnen. In Ausstrichpräparaten, die mit dem auf der Schleimhaut des Kehlkopfes und der Trachea haftenden Sekret angefertigt wurden, findet man gewöhnlich noch ein Gemisch verschiedener Bakterienarten, Streptokokken, Fränkelsche Diplokokken usw., aber unter ihnen überwiegt hier schon regelmäßig der Influenzabacillus an Zahl ganz gewaltig. In den größeren Bronchien werden die Beimengungen anderer Bakterien immer sparsamer; in den feineren mit eitrigem Inhalt gefüllten Bronchialästen ist der In-

fluenzabacillus Alleinherrscher, ebenso im Lungengewebe. Geradezu erstaunliche Mengen des spezifischen Stäbchens findet man in den graugelblichen Zentren der lobulären Influenzaherde Durchmustert man Schnitte von Influenzapneumonien mit schwacher Vergrößerung, so lenkt sich die Aufmerksamkeit sofort auf die im Präparat enthaltenen Bronchien.

In den größeren Luftröhrenästen findet man das Flimmerepithel teilweise zerstört, einzelne Epithelfetzen liegen frei im Lumen des Bronchus, an anderer Stelle ist das Epithel durch Eiterzellen von seiner Unterlage abgehoben. Man sieht die Eiterzellen in kleinen Häufchen auch in dem scheinbar intakten Epithelsaum, wo sie sich zwischen den Zylinderzellen einen Weg bahnen. Sie füllen ferner alle die Lücken aus, die durch Ausfall von Flimmerzellengruppen in der epithelialen Schicht entstanden sind und überziehen in mehr oder weniger dicker Lage die freie Oberfläche derselben. Die Kapillaren und Venen in der Umgebung der Bronchien sind strotzend mit Blut gefüllt. Das peribronchiale Bindegewebe ist von Wanderzellen durchsetzt. Ganz ähnliche Veränderungen findet man auch in den kleineren Bronchiolen, nur ist deren Lumen gewöhnlich angefüllt mit einer feinkörnigen, schlecht sich färbenden Substanz (geronnenes Mucin), die zahlreiche Eiterkörper einschließt. In den Lungenherden zeigen sich die zentralen, in frischem Zustand graugelblich erscheinenden Parteen geradezu überschwemmt von Rundzellen, welche die Alveolarlumina und Septa gleichmäßig anfüllen, so daß die Lungenstruktur scheinbar ganz verloren geht. Mehrmals fanden sich in derartig veränderten Geweben vollständig runde oder durch Kreisabschnitte begrenzte Defekte bis zu Stecknadelkopfgröße, welche den Schnitten bei der Betrachtung mit bloßem Auge ein eigentümlich poröses Gefüge verleihen ¹⁾. Ich bin geneigt, diese Defekte als kleinste Absceßchen zu deuten, deren Inhalt bei der Präparation ausgefallen, vielleicht aber auch schon intra vitam ausgehustet ist. In der Umgebung dieser eiterigen Lungeninfiltrate enthalten die Alveolen neben Rundzellen größere blasig aufgetriebene, oft pigmentierte Zellen, sogen. Lungenepithelien; je mehr man sich von dem Zentrum entfernt, desto sparsamer werden die Eiterkörperchen, und desto deutlicher tritt die alveoläre Struktur des Lungengewebes hervor. In Präparaten, die nach Weigert gefärbt sind, überzeugt man sich sofort, daß in den zentralen Infiltrationsherden Fibrin vollständig fehlt, und auch in den Randzonen höchstens spurweise vertreten ist. Das ist ein ganz typischer Unterschied zwischen der croupösen und der Influenzapneumonie, die eine Identifizierung beider Prozesse durchaus ausschließt.

Durchmustert man nun dieselben Stellen der Lungenschnitte mit starker Vergrößerung, so erhält man äußerst frappante Bilder. In den Bronchien sieht man auf dem Epithel und zwischen dessen Zellen enorme Mengen winzig kleiner Stäbchen, die sich besonders dort anhäufen, wo die Destruktion des Epithelstratum deutlicher hervortritt. Man kann sie bis ins Epithel in dichten Zügen verfolgen. In dem submukösen Bindegewebe dagegen kommen sie höchstens vereinzelt vor. Die Eiterzellen, die zwischen und auf den Flimmerzellen lagern, sind gleichfalls vollständig angefüllt mit denselben feinen Stäbchen, die sich bei Züchtungsversuchen als unzweifelhafte Influenzabacillen zu erkennen geben Ganz ähnlich ist das Bild in den zentralen Parteen der lobulären Influenzaherde. Auch hier sind die Rundzellen, welche das

1) Treffend ist meines Erachtens der Vergleich, welchen Herr Geheimrat Pfeiffer bei der Besprechung dieser Angelegenheit mir gegenüber gebrauchte, daß diese Bilder mit ihren Poren an einen Schnitt durch Schweizerkäse erinnern.

Gewebe erfüllen, geradezu überladen mit Scharen von Influenzastäbchen. Seltener findet man einzelne Bacillen oder kleine Gruppen derselben frei zwischen dem Eiter.

In den Randzonen werden die bacillenhaltigen Zellen spärlicher. Von anderen Mikroorganismen, Streptokokken, Fränkelsche Diplokokken sieht man in frischen Affektionen ebensowenig etwas in Schnitten wie in den Ausstrichpräparaten.“

Ich glaube um so mehr diese Beschreibung der Influenza-Lungenentzündung, wie sie Pfeiffer gegeben hat, in extenso wiederholen zu sollen, als, wie mir scheint, die hier vertretene Auffassung der Influenzapneumonie als eine auch pathologisch-anatomisch wohlcharakterisierte Lungenerkrankung vielfach in Vergessenheit geraten ist.

Die hier geschilderten Veränderungen sind so charakteristisch, daß wir bereits aus dem makroskopischen Befund an der Lungenschnittfläche, die Diagnose Influenza stellen konnten. Dieser charakteristischen Lungenveränderung ist es auch zuzuschreiben, daß wir den einen von den vier zur Obduktion gelangten und von uns näher untersuchten Fällen, obwohl die klinische Diagnose Carcinom und hypostatische Pneumonie lautete, sofort als Influenzapneumonie erkannten. Hier war nach einer Carcinomoperation Influenzainfektion hinzugekommen, welche unter dem klinischen Bilde einer hypostatischen Pneumonie verlief. Während wir in den größeren Bronchien, ebenso in den kleineren Verästelungen des Bronchialbaumes die Influenzabacillen zwar zahlreich, aber mit geringer Beimischung von anderen Mikroorganismen konstatieren konnten, so ergab sowohl die mikroskopische Betrachtung als auch der Züchtungsversuch, daß in den kleinen miliaren grau bis grünlich gelben Pfröpfchen Influenzabacillen in Reinkultur sich befanden. Mikroskopisch konnten wir die Influenzabacillen dicht gedrängt in Eiterzellen gelagert finden, daneben auch Haufen von Influenzabacillen außerhalb der Zellen. Ebenso konnten wir in dem die Pfröpfchen umgebenden stark entzündlich veränderten Lungengewebe in den Schnitten Influenzabacillen nachweisen. Es sind dies Befunde, die mit den Angaben R. Pfeiffers völlig im Einklang stehen. Sie sind ein weiterer Beweis für die Spezifität der Influenzabacillen bei der Influenza, denn hier ist in solchen Fällen der direkte Nachweis dafür erbracht, daß diese Bacillen die krankhaften Veränderungen tatsächlich, und zwar allein, verursachen. Nebenbei sei bemerkt, daß ich die Angaben R. Pfeiffers und später auch anderer Autoren, nach welchen auf der Höhe des Prozesses die Influenzabacillen in den Sputis meist extracellulär nachweisbar sind, in späteren Stadien der Erkrankung sowohl als auch in der Rekonvaleszenz aber innerhalb der Leukocyten sich vorfinden, vollauf bestätigen konnte.

Durch die bakteriologischen Untersuchungen ist demnach tatsächlich der Beweis erbracht, daß es sich bei der im Winter 1906/07 beobachteten Grippe um echte Influenza gehandelt hat.

Sodann ging ich daran, die Verbreitung der Influenzabacillen während dieser Epidemie bei Gesunden und scheinbar Gesunden zu erforschen. Zunächst kamen auch für mich hier in erster Reihe Leute in Betracht, welche an Lungentuberkulose erkrankt waren. Ich konnte im Winter 1906/07 unter 29 daraufhin untersuchten Auswürfen 10mal, das ist ca. 33 Proz., neben Tuberkelbacillen auch Influenzabacillen in geringer oder größerer Menge konstatieren. (Die anamnestischen Angaben erwähnten zumeist eine vor längerer Zeit überstandene Erkältung, die wohl echte Influenza gewesen sein dürfte.) Es ist dies ein Befund, welcher ja bereits von vielen Autoren, so auch schon von R. Pfeiffer,

bei Tuberkulösen während des Herrschens von Influenzaepidemieen gemacht worden war.

Ausgehend von der Erfahrung, daß bei sehr vielen Krankheiten sich die Krankheitserreger in großem Maße auf der sogenannten Pharynxtonsille vorfinden, und daß wir andererseits z. B. bei den gesunden Meningokokkenträgern die Meningokokken häufig sogar in Reinkultur daselbst finden, habe ich zunächst untersucht, ob wir bei Influenzakranken tatsächlich auf der Pharynxtonsille Influenzabacillen nachweisen können, und ferner, wie oft bei anscheinend Gesunden zurzeit der Influenzaepidemie derartige Befunde erhoben werden können. Ich bediente mich zur Entnahme des Sekrets von der Pharynxtonsille der gewöhnlichen Diphtherietupfer, nur daß ich entsprechend der anatomischen Lage der Pharynxtonsille den unteren Teil des den Wattetupfer tragenden Metalldrahtes je nach den Bedürfnissen des Falles ein wenig bog. Es erscheint mir wichtig zu betonen, daß die Aussaat auf Blutagarplatten sofort nach der Entnahme des Materials angestellt worden ist. Zunächst sei bemerkt, daß beinahe in allen Fällen von Influenza sich auf der Pharynxtonsille die Influenzabacillen in großer Zahl nachweisen ließen, ein Befund, der ja im vollen Einklang steht mit der Tatsache, daß ja fast bei jeder Influenzakerkrankung auch im Nasensekrete Influenzabacillen sich reichlich vorfinden und auch die Schleimhäute des Rachens mitbeteiligt sind. Bei den Nachforschungen nach gesunden Influenzabacillenträgern zeigte es sich, daß im Winter 1906/07 von 109 untersuchten Personen 25, d. i. ca. 24 Proz. auf ihrer Pharynxtonsille Influenzabacillen beherbergten. Kurz wiederholt, sehen wir also, daß im Winter 1906/07 tatsächlich die Verbreitung der Influenzabacillen bei nicht Influenzakranken eine auffallend große gewesen ist.

Derartige Untersuchungen würden unter gleichen Bedingungen auch in dem darauffolgenden Winter 1907/08 wiederholt, indem nur noch die letzten Ausläufer der Influenzaepidemie zur Beobachtung kamen, ferner nach dem Erlöschen der Epidemie im Sommer 1908 und selbstverständlich auch im Winter 1908/09. Ich verweise auf die beigegebene Tabelle, welche für sich selber spricht, und will die Hauptresultate mit einigen Worten hervorheben.

Während ich im Winter 1906/07, wie bereits erwähnt, bei ca. 90 Proz. von den Influenzaauswürfen Influenzabacillen nachweisen konnte, so waren im Winter 1907/08 nur in 4 von 20 Auswürfen, die unter der Diagnose Influenza eingeschickt worden waren, Influenzabacillen nachweisbar. In den anderen Fällen handelte es sich nicht um die pandemische Influenza, sondern um eine endemische Grippenform. Interessant war es, daß bereits das makroskopische Aussehen des Sputums bei den 4 positiven Fällen mich Influenza vermuten ließ, während die anderen Sputa ein für Influenza nicht typisches Aussehen aufwiesen.

Was nun die Untersuchungen Tuberkulöser auf Influenzabacillen anlangt, so habe ich, während ich im Winter 1906/07 bei ca. 33 Proz. Influenzabacillen nachweisen konnte, im Winter 1907/08 nur bei 10 Proz. Influenzabacillen gefunden, im Sommer 1908, d. i. zu einer Zeit, als die Epidemie bereits erloschen war, nur in 3,3 Proz. der Fälle, während ich im Winter 1908/09 bisher kein einziges Mal in den Auswürfen, welche zur Untersuchung an das Untersuchungsamt gelangten, Influenzabacillen nachweisen konnte. Wir sehen also, daß während der Akme der Epidemie $\frac{1}{3}$ sämtlicher Tuberkulöser mit Influenza infiziert war, daß aber die Prozentzahl der Influenzabefunde bei Tuberkulose parallel mit dem Erlöschen der Epidemie herunterging, und schließlich 2 Jahre nach dem

Erlöschen der Epidemie auf 0 herabging. Unsere Zahlen stehen in einem gewissen Gegensatz zu den Angaben anderer Autoren, welche viel öfter bei Tuberkulose auch außerhalb der Epidemiezeiten Influenzabacillen nachweisen konnten. Es dürfte das aber darauf zurückzuführen sein, daß die hier untersuchten Fälle ausschließlich Tuberkulose in den Anfangsstadien der Tuberkulose betrafen, bei denen also ausgedehntere Lungendestruktionen, in denen die Influenzabacillen sich mit Vorliebe einzunisten pflegen, noch fehlten. Wir finden also hier bei den Influenzabacillenbefunden bei Tuberkulosen einen strikten Parallelismus mit dem Aufsteigen und Abklingen der Influenzaepidemie.

Eine Beobachtung verdient bei dieser Gelegenheit wohl noch als charakteristisch hervorgehoben zu werden. Die im Winter 1906/07 aus Königsberg selbst eingesandten Sputa wiesen Influenzabacillen auf, die vom flachen Lande eingesandten Proben waren meist frei davon. Im Gegensatz dazu konnte ich im Winter 1907/08 in tuberkulösen Auswürfen, welche aus bestimmten Landbezirken stammten, plötzlich in großer Zahl Influenzabacillen nachweisen. Dadurch aufmerksam gemacht, erfuhr ich bei näheren Nachforschungen, daß nunmehr im Winter 1907/08 in den betreffenden Landgemeinden, welche während der Hauptzeit der Königsberger Epidemie influenzafrei gewesen waren, sich die Influenza, welche in Königsberg bereits im Erlöschen war, in großem Maßstabe zu verbreiten anfang. Ich glaube, daß auch hieraus hervorgeht, daß das Vorkommen von Influenzabacillen bei Tuberkulosen nicht auf eine Ubiquität der Influenzabacillen zurückzuführen ist, sondern daß es wohl stets in Zusammenhang mit einer gleichzeitigen oder vorangegangenen Influenzaepidemie zu bringen ist. Ergeben ja die klinischen Erfahrungen, daß wohl beinahe bei keiner Kategorie von Menschen während einer Influenzaepidemie ein derartiges Steigen der Mortalität beobachtet wird, als gerade bei den tuberkulösen Individuen.

In gleichem Maße wie bei den Tuberkulosen, fanden wir auch bei unseren Untersuchungen, die auf die Eruierung gesunder Bacillenträger gerichtet war, einen deutlichen Parallelismus zwischen der Prozentzahl der Bacillenträger und dem Bestehen und dem Verschwinden der Influenzaepidemien. Wir sehen, wie die Tabellen ergeben, daß auf der Höhe der Influenzaepidemie gesunde Influenzabacillenträger am häufigsten zur Beobachtung kommen. Wir sehen weiter, daß beim Abklingen der Epidemie die Prozentzahl dieser Bacillenträger erheblich sinkt, noch mehr heruntergeht nach Erlöschen der Influenzaepidemie, daß sie in einer gewissen Zeit nach dem Verschwinden der Epidemie gleich Null wird. Bemerken möchte ich, daß eine besonders große Prozentzahl von Bacillenträgern in unseren Untersuchungen Leute mit chronischen Nasenkrankheiten lieferten.

Ueerblicken wir kurz unsere Resultate, so sprechen sie überzeugend gegen die Annahme einer ubiquitären Verbreitung der Influenzabacillen und stehen in vollem Einklang mit der Auffassung R. Pfeiffers, der in den von ihm entdeckten Stäbchen den Erreger der pandemischen Form der Influenza erblickt.

*Nachdruck verboten.***Untersuchungen über Appendicitis.**

[Aus dem Kgl. hygienischen Institut zu Königsberg i. Pr. (Direktor:
Geheimrat Prof. Dr. R. Pfeiffer).]

Von Dr. E. Ungermann, I. Assistent am Institut.

Die Appendicitis erscheint als eine so charakteristische, einheitliche Infektionskrankheit, daß seit langem der Gedanke, es müsse auch ein spezifischer Erreger zu ihr gehören, in einer Menge nach dieser Richtung hin geführter Untersuchungen zum Ausdruck gekommen ist. Aber es ist bisher nicht gelungen, diesen Erreger zu finden. Vielmehr ist fast allen Bakterien, die Entzündung und Eiterung erregen, vielleicht mit Recht, die Schuld an der Entstehung der Krankheit zugeschoben worden. Demnach liegen die Verhältnisse hier ähnlich wie bei der Angina, mit der die Appendicitis ja auch in direkten ätiologischen Zusammenhang gebracht worden ist. Die Lokalisation, vielleicht das einzige Typische an der Krankheit, erklärt sich leicht durch die besonderen anatomischen Verhältnisse, die den Wurmfortsatz Läsionen, die von außen und von seinem Lumen her auf ihn einwirken, in hohem Grade ausgesetzt sein lassen; er ist relativ fest fixiert, bildet eine Fangstelle für Fremdkörper aller Art, und hat ein zartes, funktionsuntüchtiges Epithel. Es ist gewiß, daß diese anatomisch-mechanischen Momente das Entstehen einer Infektionspforte für die stets bereiten Infektionserreger erleichtern. In neuerer Zeit ist besonders von französischen Forschern die Entstehung dieses primären Epitheldefektes auf die nekrotisierende Fähigkeit einiger Anaerobier, besonders des *Bac. perfringens* und *Welchii*, zurückgeführt. Da indessen sowohl die Versuche, mit diesen Bakterien bei Schimpansen experimentell eine Appendicitis zu erzeugen, mißlingen, und auch sonst keine positiven Befunde dafür sprechen, so ist diese behauptete Bedeutung der Anaerobier für die Genese der Appendicitis noch nicht bewiesen. Somit ist die Frage des bakteriellen Anteils der Appendicitisätiologie als noch immer nicht geklärt zu bezeichnen.

Ich habe daher einer Anregung meines hochverehrten Chefs, Herrn Geheimrat Pfeiffer gern Folge geleistet, eine größere Anzahl frisch exstirpiert Appendices mikroskopisch und kulturell auf ihren Gehalt an Bakterien zu untersuchen. Das Material für diese Untersuchungen wurde mir von der hiesigen chirurgischen Universitätsklinik und einigen Privatkliniken in dankenswerter Bereitwilligkeit zur Verfügung gestellt.

Ich habe mich bei meinen Untersuchungen auf die Kultur der Aerobier beschränkt, da die nächste Absicht, welche ich dabei verfolgte, der Nachweis hämophiler, influenzaähnlicher Bakterien war, eine Absicht, die ich jedoch in keinem Falle verwirklichen konnte. Indessen zeitigten meine Bestrebungen einige für die Aetiologie der Appendicitis nicht uninteressante Tatsachen, die vielleicht im Verein mit einer Uebersicht über die Flora einer größeren Anzahl des in Frage stehenden Darm-anhanges der kurzen Darstellung wert sind.

Die in sterilen Gefäßen aufgehobenen Appendices wurden alsbald steril eröffnet; der darin enthaltene Eiter oder Schleim in Bouillon aufgeschwemmt, mit dem Glasspatel auf einer Reihe von Platten verschiedener Nährböden: gewöhnlichem und stark-alkalischem Agar, Endo-, Drygalski-, Blutagar und Serum ausgestrichen, die verschiedenen Kolonien

isoliert und weiterhin biologisch untersucht. Die Ausstrichpräparate des Blinddarm Inhalts gaben für die Untersuchung kaum irgendwelche Resultate; sie zeigten nur eine Fülle von Formen, von denen man auf den Plattenkulturen nichts sah. Nur in den Fällen 15 und 27 konnte schon aus dem Bilde des Ausstriches mit einiger Sicherheit auf die Natur der Affektion, einer Streptokokken- resp. Pneumokokkenkrankung geschlossen werden. Da diese Untersuchungsmethode im übrigen aber resultatlos war, wurde sie in der tabellarischen Uebersicht nicht berücksichtigt.

Die Resultate der Durchmusterung von Schnitten der Appendices waren bessere; immerhin aber förderten auch sie weniger zutage als zu erwarten war. Bei chronischer Appendicitis mit mäßiger Infiltration der Submucosa und wohl erhaltenem Epithel waren die tieferen Schichten der Schleimhaut vollkommen bakterienfrei; nur in den oberflächlichen Schichten sah man hier und da einzelne Stäbchen. Aber auch bei schwereren geschwürigen Veränderungen der Schleimhaut konnte man den gleichen Befund erheben. Auch dabei blieben die Bakterien oft durchaus oberflächlich. In anderen, jedoch wenigen Fällen war die Durchsetzung des Gewebes mit Bakterien außerordentlich reich.

Die folgende Tabelle gibt eine Uebersicht der Untersuchungsergebnisse von 38 Appendicitisfällen und 2 normalen Blinddärmen, welche mir von der chirurgischen Universitätsklinik zur Verfügung gestellt wurden. Die Bakterien species sind nach ihrer relativen Menge geordnet.

1. Appendicitis chronica. Hypertrophie d. Schleimhaut. Obliteration des Fundus.	Bact. coli.	Nur an der Oberfläche der Schleimhaut gramnegative Stäbchen.
2. Appendicitis acuta. Kleines Ulcus im Fundus.	Bact. coli; Sarcina flava; Staph. aureus; Streptoc. longus; Staph. albus.	An Schleimhaut und Geschwür nur oberflächlich Bakterien.
3. Appendicitis chronica obliterans.	Steril.	—
4. Appendicitis chronica.	Bact. coli.	Nur oberflächlich Kurzstäbchen. Tiefere Gewebsschichten bakterienfrei.
5. Appendicitis acuta. Starke Hypertrophie der Mucosa.	Bact. coli; Staph. aureus; Bact. proteus vulgare; Streptoc. pyogenes; Bact. pseudodiphtheriticum.	Bakterien nur an der Oberfläche.
6. Appendicitis chronica.	Bact. coli; Bact. acidi lactici.	—
7. Appendicitis chronica. Leichte Hypertrophie der Mucosa.	Bact. coli; Bact. faecale alcaligenes; Sarcina spec.; Staph. albus; Bac. vulgatus.	—
8. Appendicitis chronica. Obliteration des oberen, Empyem der beiden unteren Drittel.	Bact. coli; Streptoc. pyogenes; Bact. proteus; Staph. aureus; Diploc. lanceolatus; Bact. pseudodiphtheriticum; Staph. albus.	Auch in der Tiefe des Gewebes bis zur Muscularis grampositive, längliche Kokken in großer Menge. In den obersten Schichten grampositive Stäbchen in drusenartigen Haufen.
9. Appendicitis acuta. Vereinzelte Schleimhaut-hämorrhagien.	Bact. coli; Staph. albus; Bact. proteus; Streptoc. longus; Bact. acidi lactici.	—
10. Appendicitis chronica. Mucosa hypertrophisch. 3 ♀ Oxyurus vermicularis im Schleim.	Bact. coli.	Nur oberflächlich einige Stäbchen.

- | | | |
|--|---|--|
| 11. Appendicitis acuta.
Im Fundus ausgedehnte
Ulcerationen.
Starke Blutungen der
Schleimhaut. | Diploc. lanceolatus; Bact.
coli; Staph. aureus; Staph.
albus. | In der Mucosa grampositive
Kokken (Pneumokokken)
in dichten Haufen. |
| 12. Appendicitis chronica.
Mehrere Oxyuren auf der
Schleimhaut. | Bact. coli; Streptoc. longus;
Staphylokokken; Bact.
proteus. | Nur oberflächlich vereinzelte
Bakterien. |
| 13. Appendicitis chronica. | Bact. coli. | — |
| 14. Appendicitis chronica.
Mäßige Wucherung der
Mucosa. | Bact. coli; Sarcina flava;
Staphyl. albus; Strepto-
kokken; Bact. pneumoniae
Friedlaender. | Nur auf der Schleimhaut
Bakterien. |
| 15. Appendicitis acuta.
Mucosa hyperämisch;
sanguinolenter Schleim.
Im Fundus ziemlich fester
Kotstein. | Streptoc. pyogenes; Bact. coli;
Staphylokokken; Bact. pro-
teus; Bact. pseudodiphthe-
riticum; Sarcina spec. | Nur die oberflächlichsten
Schichten der Schleimhaut
enthalten Bakterien, vor-
wiegend Kokken. |
| 16. Appendicitis acuta.
Mucosa gewuchert; ein-
zelne Blutungen. | Bact. coli; Staphylokokken;
Bact. acidi lactici; Strep-
toc. longus; Bact. pseudo-
diphtheriticum. | Nur an der Schleimhaut-
oberfläche einzelne Bak-
terien. |
| 17. Appendicitis acuta.
Mucosa geschwollen.
Einzelne Hämorrhagien.
Blutiger Schleim. | Bact. coli; Staphylokokken;
Streptokokken; Bac. sub-
tilis; Bact. acidi lactici;
Bact. pneumoniae Friedl. | Im Gewebe keine Mikro-
organismen. |
| 18. Normaler Appendix.
Bei einer Herniotomie ex-
stirpiert. | Bact. coli; Bact. proteus;
Sarcina spec.; Staphyoc.
albus. | — |
| 19. Appendicitis chronica. | Bact. coli; Staph. aureus et
albus; Bact. pseudodiph-
theritic.; Streptoc. longus. | Bakterien nur an der Ober-
fläche. |
| 20. Appendicitis chronica.
Leichte Hypertrophie der
Mucosa; einige Blu-
tungen. | Bact. proteus; Sarcina spec.;
Bac. vulgatus; Staphylo-
kokken. | — |
| 21. Appendicitis acuta.
Perforation im Fundus.
Mucosa ausgedehnt ne-
krotisch. | Streptoc. pyogenes; Bact.
coli; Bact. proteus; Staph.
aureus; Bact. acidi lactici. | Auch in den tieferen Ge-
websteilen vereinzelte
Kokkengruppen. |
| 22. Appendicitis chronica. | Bact. coli; Bact. pseudo-
diphtheriticum; Staphylo-
kokken; Streptoc. longus;
Sarcina spec. | — |
| 23. Appendicitis chronica. | Bact. coli. | — |
| 24. Appendicitis acuta.
Im Fundus ein kleiner
Kotstein. | Bact. coli; Staphylokokken;
Bact. acidi lactici; Bact.
proteus. | Einige Stäbchen in den ober-
flächlichsten Schleimhaut-
schichten. |
| 25. Appendicitis chronica. | Bact. coli; Streptokokken. | — |
| 26. Appendicitis chronica.
Adhäsionen. Abknickung
des Fundus. Ulcus an
der Knickstelle. | Bact. proteus; Bact. coli;
Staphylokokken; Sarcina
flava; Bac. subtilis. | Nur an der Oberfläche der
Schleimhaut und des Ge-
schwüres einzelne Bakterien. |
| 27. Appendicitis acuta.
1. Trichocephalus in der
Schleimhaut. Blutiger
Schleim. Geringe Ver-
änderungen. | Diploc. lanceolatus; Staphyl.
aureus et albus; Strepto-
kokken. | Bakterien, vorwiegend Kok-
ken, nur oberflächlich ge-
legen. Die tieferen Teile
frei. |

- | | | |
|--|---|--|
| 28. Appendicitis chronica.
Im Fundus ein zirkumskriptes eitriges Infiltrat; in dessen Zentrum zwei steife Borsten tief in die Schleimhaut eingebohrt. | Bact. coli; Streptococc. pyogenes; Staphylokokken; Bact. proteus. | Im Schnitt ist das Eindringen der Kokken längs der Borsten in die Tiefe des Gewebes deutlich zu verfolgen. |
| 29. Appendicitis chronica. | Bact. coli; Staphylokokken; Sarcina spec.; Bact. pseudodiphtheriticum. | — |
| 30. Appendicitis chronica.
Empyem der beiden unteren Drittel. | Bact. coli; Bact. proteus; Streptoc. pyogenes; Staphylokokken; Bact. pneumoniae Friedl. | Bakterien nur in der nekrotischen Schleimhaut und in der Submucosa zu finden. Vorwiegend sind Streptokokken. |
| 31. Appendicitis acuta.
Ziemlich tiefes Geschwür im Fundusteil mit scharfen Rändern. | Bact. coli; Bact. faecale alcaligenes. | Gewebe bakterienfrei. |
| 32. Appendicitis acuta.
Starke Schwellung der Mucosa. Einzelne Blutungen. | Bact. coli; Streptococc. pyogenes; Staphylokokken; Bact. acidi lactici. | Nur in den oberflächlichen Schleimhautschichten Bakterien. |
| 33. Appendicitis acuta.
Im Fundus ein tiefes Geschwür. Im Lumen ein Kotkonkrement. | Bact. coli; Bact. pyocyaneum; Staphylococcus aureus. | In der Tiefe ist das Gewebe bakterienfrei. |
| 34. Appendicitis chronica. | Bact. coli; Bact. proteus; Staphylokokken; Bact. pseudodiphtheriticum. | — |
| 35. Appendicitis chronica. | Bact. coli. | — |
| 36. Appendicitis chronica obliterans. | Staphylococcus aureus (spärlich). | Gewebe bakterienfrei. |
| 37. Appendicitis chronica.
Kleines Ulcus im mittleren Drittel. | Bact. faecale alcaligenes; Bact. coli; Staphylokokken; Bac. subtilis. | Nur oberflächlich Bakterien. |
| 38. Appendicitis chronica obliterans.
Totale Verwachsung des Lumens bis auf einen kleinen unteren Abschn. | Steril. | — |
| 39. Appendicitis chronica.
Mehrere Trichocephalen im Schleim. Mucosa nicht verändert. | Bact. coli; Streptokokken; Sarcina spec.; Staphyloc. albus. | Mucosa frei von Bakterien. |
| 40. Normaler Blinddarm.
Bei einer Herniotomie reseziert. | Bact. proteus; Bact. coli; Staphyl. aureus; Sarcina spec.; Bact. acidi lactici. | — |

Aus diesen Untersuchungen folgt, daß in 5 unter 38 Fällen (No. 8, 11, 15, 21, 27) die Ursache der Appendicitis auf die alleinige Tätigkeit aërober Bakterien zurückzuführen ist; in 3 Fällen ist der Streptococcus lanceolatus, in zweien Streptococcus pyogenes der Erreger.

Beim Streptococcus lanceolatus spricht schon der Befund selbst im Blinddarm für seine ätiologische Bedeutung; denn er gehört bei seinem seltenen Vorkommen nicht zur normalen Flora des Appendix. Wo er gefunden wurde, handelte es sich um schwere Fälle chronisch-eitriger oder akuter katarrhalischer Entzündung. Für seine ätiologische Bedeutung spricht ferner der Umstand, daß er in 2 Fällen auch in

den tieferen Schichten des Gewebes nachgewiesen werden konnte. Alle drei Pneumokokkenstämme erwiesen sich für Mäuse in hohem Grade virulent. Es ist anzunehmen, daß der *Pneumococcus* eine bedeutende Rolle unter den Appendicitiserregern spielt, und daß er besonders bei der Appendicitis im Anschluß an eine Angina, die er ja so häufig auch verursacht, durch direkte Uebertragung mit den Speisen zur Blinddarm-entzündung führt.

An zweiter Stelle kommt unter den Aërobiern als sicherer Erreger der Appendicitis der *Streptococcus pyogenes* in Betracht. Allerdings ist das Urteil über seine ätiologische Bedeutung bei dem so häufigen Vorkommen von Streptokokkenformen im Blinddarm — sie wurden in 47 Proz. der Fälle gefunden — schwieriger; doch in den beiden Fällen 15 und 21 war die Zahl der Streptokokkenkolonien so groß, übertraf die der übrigen Bakterien so sehr, daß sie zweifellos als die Erreger anzusehen waren; Fall 15 ergab die Kokken fast in Reinkultur. Bei Fall 21 wurden neben sehr bedeutender Zahl der Kokkenkolonien in den Kulturen auch im Gewebe selbst Streptokokken nachgewiesen. Damit dürfte die ätiologische Bedeutung der Streptokokken in diesen Fällen gesichert sein.

Dem Einwand, daß die Kokken in diesen 5 Fällen nur eine sekundäre Rolle gespielt hätten, daß die erste Veranlassung in einem mechanischen oder toxischen Moment gegeben sei, ist schwer zu begegnen. Indessen ist es auffallend, daß gerade diese Bakterien in den Verdacht der alleinigen Täterschaft gerieten, deren das Epithel primär schädigende Wirkung aus der Pathologie anderer Organe bekannt ist; zudem lag in den Fällen 15 und 21 weder ein Fremdkörper noch ein ulceröser Prozeß, sondern eine diffuse akute katarrhalische Entzündung der Schleimhaut vor.

Nur noch in einem weiteren Falle (No. 28) konnte die Aetiologie der Entzündung des Appendix mit Sicherheit klargestellt werden; es handelte sich dabei um einen Fremdkörper, feine, steife Borsten, vielleicht von einer Zahnbürste herrührend. Daß diese feinen Borsten, die sich in die Mucosa eingespießt hatten, für die Entstehung des Schleimhautabscesses allein in Betracht kommen, daß sie den Bakterien den Weg in die Submucosa eröffneten, beweisen die Schnittpräparate, auf welchen man das Vordringen der Bakterien, vorwiegend grampositiver Kokken, längs des Stichkanals ins Bindegewebe deutlich erkennt.

Unsicher ist die Deutung des Falles 33; in diesem könnte *Bact. pyocyaneum* in den Verdacht kommen, der Erreger der Appendicitis zu sein, da es nicht zu der normalen Flora des Blinddarms gehört und in reichlicher Menge vorhanden war. Jedoch ist dies das einzige Verdachtsmoment.

In den übrigen Fällen ist die Bemessung des ätiologischen Wertes der gefundenen Bakterien und der beobachteten mechanischen Momente schwierig. Die Kulturen zeigen im allgemeinen ein ziemlich gleichförmiges, durch das zahlreiche Vorkommen von Streptokokken, Staphylokokken, Pseudodiphtherie-Kapselbacillen und Sarcinen ein an die Flora der Rachenhöhle erinnerndes Bild.

Doch übertrifft an relativer und absoluter Zahl *Bact. coli* weitaus alle übrigen Arten. Es findet sich in 90 Proz. der Fälle; daher ist die Beurteilung seiner pathogenen Bedeutung schwer. Wahrscheinlich ist diesem regelmäßigen Darmbewohner nur eine sekundäre Bedeutung beizumessen, da er bei keiner der schwereren Affektionen allein gefunden wurde. Die 6 Fälle, in denen die Kulturen nur *Bact. coli* ergaben, waren leichte chronische Formen mit geringen Schleimhautveränderungen.

Fast dasselbe gilt von *Bact. proteus vulgare*, das ebenfalls ein häufiger Gast im Blinddarm ist; es wurde in 37 Proz. gefunden, darunter in den beiden normalen Appendices. Auch ihm kommt sicher nur eine sekundäre Bedeutung zu.

Bact. faecale alcaligenes, *Bac. subtilis* und Kapselbacillen vom biologischen Verhalten des *Bact. pneumoniae* Friedl. sind relativ seltene Befunde, deren Bedeutung für die Entstehung der Appendicitis gering sein dürfte.

Ebenso bedeutungslos scheinen die in 75 Proz. der Fälle gefundenen Staphylokokken zu sein. Ihre absolute Zahl war stets ganz gering: einige wenige Kolonien auf jeder Platte, die aber wegen ihrer Größe nicht übersehen werden konnten. In Reinkultur wurde *Staphylococcus aureus* nur einmal gefunden, in Fall 36, der bereits weitgehend obliteriert war, und zwar auch nur in wenigen Kolonien.

Den Staphylokokken schließen sich die in 25 Proz. gefundenen Sarcinen in allen Verhältnissen an. Bedeutungslosigkeit in pathogener Hinsicht kommt wohl auch den nicht selten (in 20 Proz.) beobachteten zarten Kolonien kleiner Kettenkokken vom biologischen Verhalten des *Bact. acidilactici* zu. Sie fanden sich auch in einem der normalen Blinddärme.

Dagegen war der häufige Befund von Pseudodiphtheriebacillen im Inhalte des entzündeten Wurmfortsatzes von größerem Interesse. Dieselben variierten vielfach in ihrer Gestalt; einige Stämme zeigten kurze dicke Individuen, andere schlanke, echten Diphtheriebacillen sehr ähnliche Stäbchen. Die Ähnlichkeit wurde noch vermehrt durch die sehr gute Färbbarkeit der Polkörperchen nach der Neisserschen Methode, welche der Färbbarkeit des echten Diphtheriebacillus in nichts nachstand. Biologisch verhielten sich jedoch alle diese Formen gleich, und zwar wie *Bact. pseudodiphtheriticum*. Auch reagierten Meerschweinchen auf die subkutane Injektion sehr beträchtlicher Bakterienmengen nicht. Somit dürfte auch von diesen Bakterien der erste Anstoß zur Entwicklung einer Appendicitis nicht gegeben werden; sie spielen wohl nur eine sekundäre Rolle bei der Genese der Blinddarmentzündung, obwohl bemerkt werden muß, daß sie sich in einem Falle (No. 8) in der nekrotischen Schleimhaut selbst in ziemlicher Menge und drusenförmiger Anordnung vorfanden.

Wieweit die Bedeutung der Oxyuren und Trichocephalen für die Entstehung einer Appendicitis geht, konnte aus den spärlichen Befunden nicht sicher erschlossen werden. Teilweise lagen die Oxyuren in einem Gebiete stärkerer Injektion der Schleimhaut, so daß ihnen eine reizende, das Epithel schädigende Wirkung wohl nicht ganz abgesprochen werden dürfte.

Ganz bedeutungslos scheinen dagegen die glatten, von der Schleimhaut selbst geformten, ovalen, nicht sehr harten Kotkonkremente zu sein. In keinem Falle konnte in ihnen die Ursache einer schweren Entzündung gesehen werden.

Die Resultate der Untersuchungen sind folgende:

Die Aetiologie der Appendicitis ist keine einheitliche.

Die Krankheit kann durch die alleinige Tätigkeit aërober Bakterien erzeugt werden.

Von den Aërobiern kommen als Erreger hauptsächlich Pneumokokken und Streptokokken in Betracht.

Echte Fremdkörper sind zwar seltene, aber für die Genese der Appendicitis wichtige Befunde.

Die Aërobenflora des Blinddarms hat eine an die Flora der Rachenhöhle erinnernde Zusammensetzung.

Nachdruck verboten.

Können die Muskeln als Bildungsstätte der Antikörper betrachtet werden?

[Aus dem Kgl. Hygienischen Institut der Universität Königsberg i. Pr.
(Direktor: Geh. Medizinalrat Prof. Dr. R. Pfeiffer).]

Von Dr. Carlo Bezzola.

Die klassischen Versuche von Pfeiffer und Marx¹⁾ über die Bildungsstätte der Antikörper haben uns erwiesen, daß in der ersten Periode der aktiven Immunisation des Kaninchens gegen Choleravibrionen einige Organe viel größere Mengen von Antikörpern, als das Serum enthalten, andere dagegen daran ärmer sind. Zur Feststellung dieser Tatsache haben die genannten Autoren eine sehr einfache und doch einwandfreie Versuchsanordnung benutzt. Nach der Zerreißung der Organe in einer Reibschale, welche bis zum Verschwinden jeder cellulären Struktur fortgesetzt wurde, setzen sie zu gewogenen Quantitäten des Organbreies bestimmte Mengen von Bouillon hinzu.

Diese Mischungen wurden 24 Stunden im Eisschrank belassen, sodann wurde die abzentrifugierte Flüssigkeit austitriert, und zwar mittels der von Pfeiffer angegebenen Methode auf ihren Gehalt an Bakteriolysinen geprüft.

Es ergab sich, daß zunächst die Milz, in weiterer Reihenfolge das Knochenmark, die Lymphdrüsen und vielleicht auch die Lungen mehr Bakteriolysine enthalten als das Blut, während der Bakteriolysingehalt der Leber, der Nieren, des Gehirns und der Muskel usw. erheblich geringer war.

Pfeiffer und Marx sind der Ansicht, daß die Quantität von Antikörpern, welche in der zweitgenannten Gruppe von Organen enthalten sind, nur auf deren Blutgehalt zu beziehen sind, während das eigentliche Parenchym davon frei sein dürfte.

Diese Versuche stimmen überein mit den Versuchen Wassermanns¹⁾ über die Bildungsstätte der Antikörper bei Typhus.

Pfeiffer und Marx vertreten demnach die Auffassung, daß die Muskeln keine Bildungsstätte von bakteriolytischen Schutzstoffen darstellen. Im Gegensatz zu diesen Beobachtungen stehen Untersuchungen von Heim²⁾, welche kürzlich veröffentlicht worden sind. Heim hat die Muskeln eines mit Pneumokokken immunisierten Kaninchens einer besonderen Behandlung unterworfen, und es ist ihm gelungen, Extrakte zu erhalten, welche besser schützende Eigenschaften besaßen, als das Immunserum selbst. Ich möchte in Kürze den Kernpunkt des Verfahrens von Heim beschreiben.

Die Muskeln eines mit Diplokokken immunisierten Tieres werden zunächst mit einer Fleischmaschine feinstens zerhackt, später mit Aether und Aceton behufs Extraktion der Fette behandelt. Die zurückbleibende Substanz wird zunächst gut getrocknet und sodann zu einem feinen, grauweißen Pulver gemahlen. Dieses Pulver, mit 10 Teilen Wasser versetzt, wird unter Luftabschluß bei 37° C der anaëroben Fäulnis überlassen.

1) Zeitschr. f. Hyg. Bd. XXVII. p. 272.

1) Berl. med. Wochenschr. 1908. p. 209.

2) Münch. med. Wochenschr. 1909. p. 1.

In verschiedenen Zeiträumen werden sodann Proben der Faulflüssigkeit durch bakteriendichte Filter filtriert. Das Filtrat besitzt immunisierende und schützende Eigenschaften, daneben aber immer eine gewisse Toxizität, welche jedoch die Versuchsanordnung nicht wesentlich stört.

Die Resultate Heims veranlaßten mich, einige Versuche anzustellen, um zu sehen, ob durch eine analoge Versuchsanordnung, entgegen den Pfeifferschen Angaben, in den Muskeln Cholera-immuner Tiere ein Depot der spezifischen Schutzstoffe nachweisbar sein würde.

Ich wählte Choleravibrionen auch besonders deshalb, weil hier die Möglichkeit eines quantitativ genauen Arbeitens, im Gegensatz zu den Pneumokokken, gegeben war.

Zu diesem Zwecke wurden 2 Kaninchen (76 und 116) mit steigenden Dosen von bei 60° C abgetöteten Choleravibrionen intravenös immunisiert. 8 Tage nach der letzten Einspritzung wurden die Tiere entblutet. Die Muskeln wurden sorgfältig von Aponeurosen, Bindegewebe usw. befreit und später sehr fein zerhackt. Ein Teil der Gesamtmasse wurde genau gewogen, getrocknet und dann nach dem Verfahren Heims der Fäulnis unterworfen. Zur Kontrolle wurde eine kleinere Portion derselben frischen Muskelmasse fein verrieben und mit 5 Gewichtsteilen physiologischer Kochsalzlösung vermischt.

Die so gewonnene Emulsion wurde einerseits sofort titriert und dann nach verschieden langer Fäulnis von neuem auf ihren Gehalt an bakteriolytischen Antistoffen untersucht.

Tabelle.

Vergleichende Resultate der schützenden Kraft der Muskelextrakte (frisch und gefault) und des Serums des Kaninchens 116, welches, wie oben gesagt, mit Choleravibrionen immunisiert wurde:

	Datum der Bestimmung	Minimalmenge des zum völligen Schutze nötigen Extraktes	Dement- sprechende Menge der frischen Muskeln	Titer des Serum
Frischer Muskelextrakt (1:6 in physiologischer Kochsalzlösung). Austitrierung desselben nach 20 Std. im Schüttelapparate.	5. März	0,1 ccm	= 0,0166	0,0001
Dieselbe Muskelemulsion wird nachher bei 37° unter Paraffinöl gelassen und auf ihre schützende Wirkung systematisch untersucht.	6. März	0,1 ccm	= 0,0166	
	7. „	0,1 „	= 0,0166	
	8. „	0,5 „	= 0,083	
	10. „	>1 „	= >0,166	
	14. „	>1 „	= >0,166	

Die Austitrierung der Extrakte sowie des Immunserums wurde mittels des Pfeifferschen Versuches gemacht.

Die beigegebene Tabelle zeigt die Ergebnisse eines derartigen Versuches. Wir sehen, daß die gleiche Menge Serum in Harmonie mit Pfeiffers Angaben 16-fach stärkere bakteriolytische Wirkung besitzt, als die frische Muskelsubstanz. Die sich einstellende Fäulnis ließ den bakteriolytischen Titer 0,0166 zunächst 48 Stunden lang unverändert. Nach 72 Stunden sehen wir ein Sinken der bakteriolytischen Wirksamkeit auf $\frac{1}{5}$ des ursprünglichen Wertes (Titer ist 0,083).

Ein weiteres Sinken beobachten wir nach 96 Stunden. Bei meiner Versuchsanordnung ist daher ein Freiwerden von Bakteriolytinen aus den zerfallenden Muskelfasern nicht zu beobachten. Im Gegenteil sehen wir eine progressive Verminderung.

Zu ganz ähnlichen Ergebnissen kam ich unter genauer Befolgung der Heimschen Versuchsanordnung. Mir ist es nie gelungen, durch Fäulnis eine Erhöhung des bakteriolytischen Titers zu erzielen. Im Gegenteil war die schützende Kraft der gefaulten Muskelsubstanz stets geringer als jene des frischen Muskelextraktes und selbstverständlich sehr viel niedriger als die des Serums.

Ich möchte noch auf eine Sache aufmerksam machen, die, ganz oberflächlich betrachtet, vielleicht zu falschen Schlußfolgerungen Veranlassung geben könnte.

Nehmen wir z. B. einen Teil Muskelpulver und 10 Teile Wasser nach Heim und lassen wir die Aufschwemmung 20 Stunden im Schüttelapparat, so sehen wir, daß das Pulver fast vollständig ungelöst bleibt und daß das Filtrat auch in einer Menge von 1 ccm keine Schutzwirkung im Pfeifferschen Versuch entfaltet. Setzt man eine solche Aufschwemmung unter Paraffinöl bei 37° C in dem Brutschrank der Fäulnis aus und titrieren wir systematisch zu verschiedenen Zeiten, selbstverständlich nach Filtration, die schützende Wirksamkeit der Faulflüssigkeit aus, so können wir manchmal sehen, daß die anfangs unwirksame Emulsion einen gewissen, wenn auch sehr kleinen, bakteriolytischen Titer erhält, so daß z. B. in einem Versuche schon 0,5 resp. 0,1 des Filtrates nach 10 resp. 15 Tagen (bei 37° C) imstande war, im Pfeifferschen Versuch ein Tier zu retten. Nach weiterer Zeit aber verschwindet die bakteriolytische Wirkung wieder vollständig. Stets ist die Wirksamkeit der Faulfiltrate geringer als die der frischen Muskelextrakte. Die Erklärung dieser Tatsache scheint mir ganz einfach zu sein. Solange das Eiweiß ungelöst bleibt, können natürlich die Immunsustanzen nicht in die umgebende Flüssigkeit diffundieren. Daher kann das Filtrat in diesem Moment keine bakteriolytische Wirkung ausüben, was ja auch unser Versuch bestätigt. Wird ein derartiges Muskeleiweiß aber der Fäulnis ausgesetzt, so tritt eine allmähliche Zerstörung ein, so daß die zur betreffenden Zeit noch erhaltenen Immunsustanzen, die freilich ja immer auch geschädigt werden, in die Flüssigkeit diffundieren können. Daher zeigt auch erst bei fortschreitender Fäulnis ein derartiges Filtrat vorübergehend eine schützende Wirkung. Schreitet aber die Fäulnis weiter vor, so werden auch die Immunsustanzen allmählich wieder zerstört. Sind diese Versuche auch nicht direkt gegen die Anschauungen Heims für die Immunität gegen Pneumokokken beweisend, so zeigen sie doch, daß sicherlich Heims Hypothese einer allgemeinen Geltung entbehrt und daß, wenigstens bei der Choleraimmunität, die Dinge ganz anders liegen und sich in vollständigem Einklang mit den Versuchen von Pfeiffer und Marx befinden.

Nachdruck verboten.

Sind die Hämolsine und die Cytotropine (Neufeld) verschiedene Substanzen?

[Aus dem Hygienischen Institut der Universität Königsberg i. Pr.
(Direktor: Geheimrat Prof. Dr. R. Pfeiffer).]

Von Dr. Carlo Bezzola.

In ihren klassischen Versuchen haben Denys und Leclef bewiesen, daß Streptokokkenimmunserum die Phagocytose virulenter Streptokokken, welche sonst, ohne die Gegenwart des Immunserums von den Leukocyten nicht aufgenommen werden, in ausgesprochener Weise befördert, und zwar wirkt das Immunserum nicht wie ein Stimulin im Metschnikoffschen Sinne, direkt auf die Leukocyten, sondern es beeinflusst die Mikroorganismen, welche dadurch phagocytabel werden.

Eine genauere Erforschung dieses Phänomens verdanken wir einerseits Wright und seinen Schülern in England und andererseits Neufeld in Deutschland.

Wright hat besonders die Phagocytose befördernde Wirkung normaler Sera studiert und die hierbei in Funktion tretenden Substanzen als Opsonine bezeichnet, während Neufeld die analogen Körper im Immunserum untersuchte und ihnen den Namen Bakteriotropine beilegte.

Wir wissen jetzt ziemlich bestimmt, daß die Opsonine komplexer Natur sind und aus einem ambozeptorartigen Körper und aus einem Komplement sich zusammensetzen. Viel spricht auch dafür, daß die Opsonine mit den Normalbakteriolysinen identisch sind.

Im Gegensatz dazu behauptet Neufeld¹⁾, daß die Bakteriotropine ohne jede Mitwirkung des Komplementes die Phagocytose befördern, und daß sie Substanzen sui generis sind, durchaus verschieden von den Immunbakteriolysinen.

Er stützt diese Annahme hauptsächlich auf folgende Tatsachen:

1) Es gibt Immunsera, die, wie z. B. das Paratyphus B-Serum, die überhaupt keinen bakteriolytischen Titer zeigen, dagegen ausgesprochene bakteriotropische Effekte.

2) In Seris, in welchen die beiden Wirkungen nebeneinander vorkommen, gehen dieselben keineswegs immer parallel. Es kann ein starker Gehalt an Bakteriotropinen mit einer Minimalmenge von Bakteriolysinen zusammentreffen und umgekehrt.

3) Es gelingt durch verschiedene Methoden bei geeigneter Versuchsanordnung, Lysine und Tropine voneinander zu trennen.

Da die Verhältnisse bei der Bakterieninfektion überaus kompliziert liegen, so hat Neufeld in Gemeinschaft mit Bickel²⁾ sich bemüht, seine Anschauungen durch Untersuchungen an hämolytischen resp. hämotropischen Seris zu stützen. Ich habe in meiner Arbeit „Ueber die bakteriolytischen Eigenschaften des Paratyphus B-Immunserums“³⁾ den Nachweis geführt, daß bei dem Paratyphusserum, auf welches Neufeld immer wieder mit besonderem Nachdrucke hinweist, die Dinge ganz anders liegen, als sie von Neufeld da geschildert

1) Vergl. Neufeld in Kolle und Wassermann.

2) Arb. a. d. Kais. Ges.-Amt. Bd. XXVII. 1907. p. 310.

3) Diese Zeitschrift.

worden sind, und daß dieses Serum geradezu als Paradigma eines spezifischen bakteriolytischen Immunserums betrachtet werden kann. In folgender Arbeit habe ich an einigen prägnanten Beispielen das Verhältnis der Hämolsine zu den Hämotropinen zu studieren mich bemüht.

Zunächst stellte ich Versuche darüber an, wie sich die Kurven zueinander verhalten, unter welchen das Entstehen, Ansteigen und Verschwinden der Hämotropine und Hämolsine bei Immuntieren vor sich geht, was um so wichtiger war, als Neufeld den Mangel an Parallelismus im Verlauf der beiden Kurven als Beweis gegen die Identität der beiden Substanzen ins Treffen führt.

Für diese Versuche wurden 10 Kaninchen mit gewaschenen Ziegenblutkörperchen vorbehandelt mittels Injektionen von zwischen 0,1 ccm und 1 ccm variierenden Blutmengen, wie folgende Tabelle I zeigt:

Tabelle I.

No.	Gewicht der Tiere	Menge des intravenös eingespritzten Ziegenblutes	Datum der Einspritzung	
314	1800 g	0,5 ccm	30. April 08	Mit Phenolzusatz (je 0,1 einer 5-proz. Lösung für ccm) im Dunkeln bei Zimmertemperatur aufbewahrt
315	dgl.	dgl.	dgl.	
316	"	"	"	
317	1700 g	"	"	
4	2000 g	1 ccm	26. Okt. 08	Im „Frigo“ aufbewahrt
5	2050 "	dgl.	dgl.	
5	1950 "	"	"	
27a	2000 g	0,1 ccm	17. Nov. 08	Mit Phenolzusatz im Dunkeln bei Zimmertemperatur aufbewahrt
		1 "	26. Jan. 09	
		dgl.	2. Febr. 09	
27	2000 g	0,1 ccm	17. Nov. 08	Im „Frigo“ aufbewahrt
26	dgl.	dgl.	dgl.	
		(mit Serum 315 beladen)		

In verschiedenen Zeiträumen wurden bei allen Kaninchen systematische Blutentnahmen aus der Ohrvene gemacht. Sowohl der hämolytische als auch der hämotropische Titer aller Sera eines und desselben Tieres wurde zu gleicher Zeit geprüft.

Die Sera der Kaninchen 314, 315, 316, 317, 27 a wurden inaktiviert, phenolisiert und im Dunkeln bei Zimmertemperatur aufbewahrt, während jene der Kaninchen 4, 5, 6, 26, 27 nach der Inaktivierung ohne Phenolzusatz in „Frigo“ konserviert wurden.

Die Tabelle II zeigt die Hämolsin- und Cytotropinkurve bei Kaninchen 26.

In diesem durchaus typischen Falle sehen wir, daß das Entstehen der cytotropischen Wirkung parallel geht mit einem Ansteigen der Hämolsine. Zu demselben Ergebnisse kam ich bei Versuchen, die ich mit den übrigen analog gewonnenen Seris angestellt habe; nur 2 Kaninchen-sera, bei denen eine geringe Verschiedenheit der beiden Kurven zu beobachten war, machten eine Ausnahme. Auch hier war anfänglich der Verlauf derselben ein ganz paralleler; während jedoch am Schlusse der Beobachtungszeit der hämolytische Titer zur Norm herabgesunken war, konnte dagegen immer noch eine, wenn auch nicht sehr große cytotropische Wirkung konstatiert werden. Das zur Kontrolle benutzte Normalserum desselben Tieres war cytotropisch wirkungslos.

Neufeld und Bickel haben als Beweis der Verschiedenheit der Cytotropine und Hämolsine auch eine Beobachtung herangezogen, die sie an alten Immunseris gemacht haben. Derartige Sera sollen viel

Tabelle II.

Das Kaninchen 26 hat am 18. Nov. 0,1 gewaschenes Ziegenblut endovenös eingespritzt bekommen.

Phagocytose nach 1 Stunde bei 37°					
Serum 26 inaktiviert	17. Nov.	23. Nov.	28. Nov.	2. Dez.	
0,1	0	sehr stark	sehr stark	sehr stark	Je 0,1 ccm 5-proz. Ziegenblut je 0,2 Leukocytenaufschwemmung. Alle Röhrchen am 0,6 ccm aufgefüllt
0,05	0	dgl.	dgl.	dgl.	
0,01	0	stark	"	"	
0,005	0	gering	stark	stark	
Hämolyse nach 2 Stunden bei 37°					
0,1	komplett	komplett	komplett	komplett	Je 0,1 Meerschweinchenkomplement. Alle Röhrchen am 2 ccm aufgefüllt
0,05	dgl.	"	"	"	
0,01	0	"	"	"	
0,005	0	"	"	"	
0,001	0	"	"	"	
0,0005	0	Kuppe	trübe	trübe	

früher ihre cytotropische Wirksamkeit als ihre hämolytische Fähigkeit einbüßen. Um diesen Befund nachzuprüfen, habe ich eine Reihe von phenolisierten Immunseris in verschiedenen Zeiträumen austitriert.

Wie die Tabelle III und IV zeigen, habe ich hier in Analogie mit den Ergebnissen Neufelds und Bickels mich überzeugt, daß tatsächlich die cytotropische Wirkung bei längere Zeit aufbewahrten, phenolisierten Seris völlig verschwindet, während der hämolytische Effekt der Sera erhalten bleibt.

Tabelle III.

Kaninchen 314.

Phagocytose nach 1 Stunde bei 37° (17. Mai)						
Serum 314 inaktiviert u. phenolisiert	29. April	4. Mai	6. Mai	9. Mai	12. Mai	15. Mai
0,1	0	gering	sehr stark	sehr stark	sehr stark	sehr stark
0,05	0	"	dgl.	stark	dgl.	dgl.
0,01	0	0	"	"	"	mäßig stark
0,005	0	0	mäßig stark	mäßig stark	mäßig stark	dgl.
0,001	0	0	0	gering	gering	gering
23. Okt.						
0,1	0	0	0	0	0	0
0,05	0	0	0	0	0	0
0,01	0	0	0	0	0	0
0,005	0	0	0	0	0	0

Versuchsanordnung wie in Tabelle I

In Anbetracht der klassischen Versuche Pfeiffers, welche gezeigt haben, daß mit einem Ueberschuß von Choleraimmunserum abgesättigte Choleravibrionen keinen oder einen bedeutend verminderten Immunsierungseffekt haben, und der entsprechenden Angaben von Sachs, welche sich auf beladene rote Blutkörperchen beziehen, lag es nahe, zu prüfen, wie sich Erythrocyten bei der Immunisierung verhalten würden, die möglichst vollständig mit einem alten, cytotropinfrei gewordenen, aber noch hämolytischen Serum abgesättigt waren. Es mußte bei dem mit derartig vorbehandelten Erythrocyten immunisierten Tiere eine gute Cytotropinbildung, aber eine bedeutend verminderte Hämolsinbildung erwartet werden. Ich benutzte folgende Versuchsanordnung:

Tabelle IV.

Kaninchen 315.

Phagocytose nach 1 Stunde bei 37° (18. Mai)						
Serum 315 inaktiviert u. phenolisiert	29. April	4. Mai	6. Mai	9. Mai	12. Mai	15. Mai
0,1	0	0	sehr stark	sehr stark	sehr stark	sehr stark
0,05	0	0	dgl.	stark	stark	dgl.
0,01	0	0				stark
0,05	0	0	mäßig stark	mäßig stark	mäßig stark	mäßig stark
0,001	0	0	0	0	0	0
26. Okt. 08						
0,1	0	0	0	0	0	0
0,05	0	0	0	0	0	0
0,01	0	0	0	0	0	0
0,005	0	0	0	0	0	0
13. Febr. 09						
0,1	0	0	0	0	0	0
0,05	0	0	0	0	0	0
0,01	0	0	mäßig stark	0	0	gering
0,005	0	0	0	0	0	0

Versuchsanordnung wie in Tabelle I

0,1 ccm gewaschener Ziegenblutkörperchen werden mit einer überschüssigen Menge des Serums 315 (3 Stunden bei Zimmertemperatur) vorbehandelt, sodann abzentrifugiert und in 1 ccm physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmt dem Kaninchen 27 intravenös injiziert. Kaninchen 26 bekommt zur Kontrolle die gleiche Menge nicht vorbehandelter Ziegenblutkörperchen (Tabelle II).

Zu meiner größten Ueberraschung mußte ich aber konstatieren, daß, wie es Tabelle V zeigt, zwar die Hämolsinbildung ganz nach Erwarten vermindert war, daß aber auch die Cytotropinbildung eine parallelgehende Verminderung aufwies. Auch hier bemerken wir, ebenso wie in Tabelle II, ein mit dem Ansteigen der Hämolsine parallel gehendes Anwachsen der cytotropischen Wirkung.

Tabelle V.

Serum des Kaninchens 27 wie oben gesagt behandelt.

Phagocytose nach 1 Stunde bei 37°				
Serum 27 inaktiviert	17. Nov.	23. Nov.	28. Nov.	2. Dez.
0,1	0	gering	stark	sehr stark
0,05	0	0	"	stark
0,01	0	0	mäßig stark	mäßig stark
0,005	0	0	0	0
0,001	0	0	0	0
Hämolyse nach 2 Stunden bei 37°				
0,1	komplett	komplett	komplett	komplett
0,05	"	"	"	"
0,01	0	trübe	"	"
0,005	0	0	"	"
0,001	0	0	0	0

Versuchsanordnung wie in Tabelle I

Dieser Versuch schien mir dafür zu sprechen, daß möglicherweise der Verlust an Cytotropinen nur ein scheinbarer sein könnte, daß, mit anderen Worten, beim längeren Aufbewahren in den Seris Veränderungen

eintreten mögen, welche irgendwie die Phagocytose hindern. Eine derartige Auffassung schien mir um so näher zu liegen, als ich ausschließlich bei den phenolisierten, nicht aber bei ohne Karbolzusatz in „Frigo“ aufbewahrten Seris diese merkwürdige Veränderung konstatieren konnte (vgl. Tabelle VI).

Tabelle VI.

Kaninchen 5.

Phagocytose nach 1 Stunde bei 37° (10. Dez.)								
Serum 5 inaktiviert	26. Okt.	29. Okt.	1. Nov.	4. Nov.	7. Nov.	12. Nov.	19. Nov.	15. Nov.
0,1	0	0	sehr stark	sehr stark	sehr stark	sehr stark	sehr stark	sehr stark
0,05	0	0	dgl.	dgl.	dgl.	dgl.	dgl.	dgl.
0,01	0	0	stark	stark	stark	stark	stark	stark
0,005	0	0	mäßig stark	mäßig stark	mäßig stark	mäßig stark	gering	stark
0,001	0	0	0	0	gering	0	0	0
12. Febr.								
0,1	0	0	sehr stark	sehr stark		sehr stark	sehr stark	sehr stark
0,05	0	0	dgl.	dgl.		dgl.	dgl.	dgl.
0,01	0	0	stark	stark		stark	stark	stark
0,005	0	0	0	mäßig stark		mäßig stark	mäßig stark	stark
0,001	0	0	0	0		gering	0	0

Versuchsanordnung wie in Tabelle I

Es lag der Gedanke nahe, die Hemmung der Phagocytose dem Phenol selbst zuzuschreiben.

Die Tabelle VII gibt uns Aufschluß über die Beeinflussung der cytotropischen Wirkung durch das Phenol.

Tabelle VII.

Phagocytose nach 1 Stunde bei 37°			
Cytotropisches Serum Serum 4 (4. Nov.)	Phenol		
0,1	0,0005	sehr gering	Versuchsanordnung wie in Tabelle I
0,05	0,0005	dgl.	
0,01	0,0005	0	
0,1	—	sehr stark	
0,05	—	dgl.	
0,01	—	mäßig stark	
0,05	0,0005	0	
0,05	0,00025	mäßig stark	
0,05	0,00005	sehr stark	
0,05	0,000025	dgl.	
0,05	—	„	

Aus unseren Versuchen geht hervor, daß tatsächlich das Phenol die Freßtätigkeit der Leukocyten ungünstig beeinflusst, allein diese Hemmung ist zu gering, als daß wir das so vollständige Verschwinden der cytotropischen Wirkung auf Rechnung des Phenols setzen könnten. Nur in jenen Versuchen könnte man das Phenol für das Ausbleiben der Phagocytose verantwortlich machen, in welchen größere Mengen des phenolisierten Immunserums von 0,1 ccm und darüber angewandt worden waren. In kleineren Serumquantitäten ist der Phenolgehalt so gering, daß es wohl für die die Phagocytose hemmende Wirkung nicht in Betracht kommt.

Es ist dabei zu berücksichtigen, daß meinen Immunseris ursprünglich

eine starke cytotropische Wirkung zukam, bis zu Dosen von 0,005 ccm, a sogar bis zu 0,001 ccm herab. Wir sind daher gezwungen, noch nach weiteren Erklärungsgründen für die Hemmungswirkungen zu suchen.

Eine logische Folge dieser Betrachtungen war es, das Studium alter phenolisierter Normalsera heranzuziehen und ihre Einwirkung auf den die Phagocytose befördernden Effekt der Immunsera zu prüfen.

Da ich kein altes Normalserum vorrätig hatte, so habe ich ein 2 Jahre altes Coli-Kaninchenserum verwandt, welches ich wohl in bezug auf seine hämotropische und hämolytische Wirkung als Normalserum bezeichnen darf.

Ich möchte bemerken, daß dieses Serum seinerzeit inaktiviert und phenolisiert worden war. Eine Prüfung dieses Serums ergab, wie zu erwarten, ein gänzlich Fehlen aller cytotropischen Eigenschaften. Ich wollte nun sehen, ob vielleicht dieses Serum imstande sein würde, eine Hemmung der Phagocytose bei gut hämotropisch wirksamen Immunseris hervorzurufen. Die Versuchsanordnungen sind ersichtlich aus den Tabellen VIII und IX.

Tabelle VIII.

Phagocytose nach 1 Stunde bei 37°			
Hämotropisches Immunserum Serum 6 (4. Nov.) inaktiviert	Altes phenolisierendes Kaninchen-Coli-Serum 175		
0,1	—	sehr stark	Versuchsanordnung wie in Tabelle I
0,05	—	dgl.	
0,01	—	"	
0,005	—	stark	
0,05	0,1	0	
0,05	0,1	0	
0,05	0,05	mäßig stark	
0,05	0,05	gering	
0,05	0,01	stark	
0,05	0,01	mäßig stark	
—	0,1	0	
—	0,05	0	

Tabelle IX.

Phagocytose nach 1 Stunde bei 37°		
Hämotropisches Immunserum Serum 4 (25. Nov.) inaktiviert	Serum 175 altes Kaninchen-Coli-Serum	
0,1	—	sehr stark
0,05	—	dgl.
0,01	—	"
0,005	—	"
0,001	—	mäßig stark
0,05	0,1	0
0,005	0,1	0
0,05	0,05	0
0,005	0,05	0
0,05	0,01	stark
0,005	0,01	mäßig stark
0,15	—	sehr stark
0,2	—	stark
—	0,1	0
—	0,05	0

Aus der Tabelle VIII geht hervor, daß tatsächlich das Serum 175 eine anticytotropische Wirkung entfaltet. Wir sehen aus dieser Tabelle, daß

0,1 ccm dieses Serums imstande ist, die cytotropische Wirkung von sonst stark hämotropen Immunseris vollständig aufzuheben, auch wenn ein vielfaches Multiplum der einfach hämotropen Serumquantität verwendet wird.

In der Tabelle IX sind die Ergebnisse noch deutlicher. Hier sehen wir, daß bereits 0,05 ccm des Serums 175 (Mengen also, bei denen eine Wirkung des Phenols an sich ausgeschlossen ist) imstande ist, eine gänzliche Aufhebung der cytotropischen Wirkung zu verursachen, und zwar bei 0,05 ccm eines stark cytotropischen Serums, welches für sich allein schon in der Menge von 0,001 ccm eine vollständige Phagocytose ergibt.

Noch 0,01 ccm des Serums 175 zeigt eine deutliche hemmende Wirkung. Beim Vergleiche der Resultate unserer beiden Tabellen sehen wir eine Tatsache, welche unsere Aufmerksamkeit verdient. Dasselbe Serum 175 übt nicht die gleiche Hemmungswirkung in beiden Versuchsreihen aus. Die hemmende Wirkung ist größer beim zweiten Versuche, obwohl auch die cytotropische Wirkung des dabei benutzten Immunserums eine 5mal größere ist, als die des in Tabelle VIII angewandten hämotropischen Serums.

Welches ist nun der Mechanismus dieser Hemmungswirkung des Serums 175, resp. welches ist die Ursache des Verschwindens der cytotropischen Wirkung in alten Seris?

Handelt es sich um eine richtige Zerstörung der cytotropischen Substanz, oder ist nur die Wirkung dieser Substanz durch irgendeinen Umstand paralysiert?

Zur Beantwortung dieser Frage benutzte ich ein sehr stark hämolytisch wirkendes Serum (Serum 27a, Titer 0,0005), welches 10 Tage zuvor phenolisiert worden war, und das Serum 315, welches in phenolisiertem Zustande 8 Monate aufbewahrt worden war.

Die Tabelle X zeigt uns zunächst das Verhalten dieser cytotropischen Sera bei Anwendung der Neufeldschen Versuchsanordnung.

Tabelle X.

Phagocytose nach 1 Stunde bei 37°		Phagocytose nach 1 Stunde bei 37°	
Serum 315 (12. Mai) inaktiviert u. phenolisiert nach 8 Monaten Aufbewahrung		Serum 27a inaktiviert u. phenolisiert nach 10 Tagen Aufbewahrung	
0,1	mäßige Agglutination	0,2	0
0,05		0,1	0
		0,05	mäßig stark
		0,05	sehr stark

Tabelle XI zeigt die Resultate, die mit einer nun zu beschreibenden Modifikation der Versuchsanordnung gewonnen worden sind.

Es wurden hier die roten Blutkörperchen der Ziege mit entsprechenden Quantitäten des Immunserums beladen und dann abzentrifugiert. Dann mit 0,4 ccm physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmt und mit 0,2 ccm der gewöhnlichen Leukocytenaufschwemmung versetzt.

Tabelle XI.

Phagocytose nach 1 Stunde bei 37°		Phagocytose nach 1 Stunde bei 37°	
Serum 315 (12. Mai) Vgl. Tabelle X		Serum 27a Vgl. Tabelle X	
0,1	mäßige Agglutination	0,2	sehr stark
0,05		0,1	dgl.
		0,05	"
		0,01	"

Wir sehen beim Vergleichen der beiden Tabellen einen sehr frappanten Unterschied. Beide Sera (315 sowie 27a) haben bei Innehaltung der Neufeldschen Methodik anscheinend gar keine cytotropische Wirkung, wenigstens nicht in höheren Dosen bis zu 0,05 ccm herab. Auffälligerweise wird bei dem Serum 27 bei Dosen unter 0,05 ccm eine deutliche hämotropische Wirkung bemerkbar. Auf die Erklärung dieser merkwürdigen Anomalie werde ich bald zurückkommen.

Im Gegensatz dazu zeigen bei der zweiten Versuchsanordnung, wo die im Serum beladenen Blutkörperchen von dem Restserum getrennt wurden, sowohl das Serum 315 wie das Serum 27a sehr starke hämotropische Wirkung.

Aus diesen Versuchen geht hervor, daß die Cytotropine aus den Seris keinesfalls absolut verschwunden sind, sondern daß nur ihre Wirksamkeit durch andere entgegengesetzt wirkende Substanzen verdeckt wird. Dies wird durch unsere Versuchsanordnung bewiesen, wo wir diese beiden Substanzen durch die Absorptionsmethode derart trennen, daß die Cytotropine an den roten Blutkörperchen haften bleiben, während die hemmenden Substanzen im Restserum zurückbleiben.

Wir verstehen jetzt auch das negative Resultat, welches wir bei früheren Versuchen (Tabelle V) durch Immunisierung mit Erythrocyten erhielten, welche mit einem hämolytischen Immunserum, das durch längere Konservierung seine Cytotropine anscheinend völlig verloren hatte, abgesättigt waren. Die Tatsache, daß unter solchen Umständen trotzdem beide Reihen von Immunsustanzen sowohl Cytotropine als Hämolsine gebildet wurden, erklärt sich nun mit größter Leichtigkeit.

Auch die oben betonte Tatsache, daß Immunserum 27a (Tabelle X) in stärkeren Dosen cytotropisch unwirksam sich zeigte, in schwächeren aber die Phagocytosis begünstigte, Resultate, welche mit gewissen von Neufeld erhaltenen im Einklang stehen und welche Analoga auch in dem Verhalten agglutinierender Sera finden, wird nunmehr dem Verständnis zugänglich durch die Annahme, daß auch in relativ frischem, noch nicht lange unter Phenolwirkung stehendem Serum hemmende Substanzen sich bilden können.

Tabelle XII beweist, daß ganz ähnliche Hemmungswirkungen sich nachweisen lassen gegenüber dem opsonischen Effekt eines ganz frischen, ohne Phenolzusatz hergestellten Normalkaninchenserums. Dieses Serum hat in Neufeldscher Anordnung überhaupt keine hämotropische Wir-

Tabelle XII.

Phagocytose nach 1 Stunde bei 37°		
Normalkaninchen- serum inaktiviert		
0,3 0,1 0,05	stark mäßig stark 0	0,1 einer 5-proz. gewaschenen Ziegenblutaufschwemmung werden mit dem Normalkaninchenserum 30 Min. bei 37° beladen. Nach Zentrifugieren und Dekantieren wird physiologische Kochsalzlösung bis zu 0,4 und dann 0,2 Leukocytenaufschwemmung zugesetzt
0,3 0,2 0,1 0,05	0 0 gering 0	
		Versuchsanordnung wie in Tabelle I

kung, dagegen trat die letztere sehr deutlich hervor bis zu 0,1 ccm herab, wenn, ähnlich wie in Tabelle XI, das restierende Serum nach der Beladung der roten Blutkörperchen abzentrifugiert wurde.

Die Ergebnisse unserer 3 letzten Tabellen erklären auch den Umstand, daß Neufeld und Bickel im Normalserum in der Regel keine Spur einer cytotropischen Wirkung beobachten konnten, auch bei Anwendung großer Mengen. Es kann daher diese Tatsache zurzeit nicht mehr als ein stringenter Beweis für die Verschiedenheit von Opsoninen und Tropinen betrachtet werden.

Wir kommen daher zu der wichtigen Folgerung, daß man in jedem Serum zwei entgegengesetzte Wirkungen beobachten kann: Eine, welche die roten Blutkörperchen phagocytabel macht, eine andere, welche die Phagocytose behindert. Das tatsächliche Endresultat entspricht der algebraischen Summe beider Faktoren.

Da es gelingt, durch die Absorptionsmethode die Cytotropine von den Hemmungskörpern zu trennen, so war ich bemüht, auf diesem Wege über letztere Substanzen Näheres zu erfahren.

Zu diesem Zwecke habe ich in den folgenden Versuchen Gemische von cytotropischen Immunseris mit Normalkaninchenserum hergestellt, welches mittels Absorption durch rote Blutkörperchen von hämolytischen und hämotropischen Substanzen befreit war (Tabelle XIII).

Tabelle XIII.

2 ccm Normalkaninchenserum + 2 ccm physiologischer Kochsalzlösung werden 4 Stunden lang bei Zimmertemperatur mit 5 ccm gewaschenen Ziegenblutes im Kontakt gelassen. Das nach der Zentrifugierung gewonnene Serum entfaltet keine hämolytische Wirkung für Ziegenblutkörperchen und wird in der Tabelle mit α bezeichnet.

Phagocytose nach 1 Stunde bei 37°		
Cytotropisches Immunserum. Serum 4 (12. Nov.) inaktiviert	Kochsalzlösung und N.K.S.-Mischung 1:1 α	
0,01	0,2	mäßig stark
0,005	0,2	0
0,001	0,2	0
0,0005	0,2	0
0,01	—	sehr stark
0,005	—	stark
0,001	—	mäßig stark
0,0005	—	0
Cytotropisches Serum Serum 6 (12. Nov.)		
0,01	0,2	mäßig stark
0,005	0,2	dgl.
0,001	0,2	0
0,0005	0,2	0
0,01	—	sehr stark
0,005	—	dgl.
0,001	—	mäßig stark
0,0005	—	0
—	0,2	0
—	0,4	0

Es ergibt sich aus dieser Tabelle, daß 0,1 ccm eines so vorbehandelten Normalkaninchensersums bei einem in Kontrollversuchen stark hämotropisch wirkenden Immunserum eine sehr deutliche Hemmung der Phagocytose erzeugt, wenn die Menge des Immunserums kein zu starkes Multiplum des hämotropischen Titers darstellt.

Allerdings habe ich auch einen Versuch, Tabelle XIV, zu registrieren.

in welchem keine Spur von hemmender Wirkung desselben in Tabelle XIII benutzten ausgefallten Normalserums zu sehen ist, und sehr merkwürdigerweise einem hämotropischen Immunserum gegenüber, welches von demselben Kaninchen No. 4 stammte, das zu dem in Tabelle XIII angegebenen Versuche gedient hatte, nur mit dem einzigen Unterschiede, daß die beiden Serumproben in verschiedenen Zeiträumen (13 Tage Intervall) entnommen worden sind.

Tabelle XIV.

Phagocytose nach 1 Stunde bei 37 °		
Cytotropisches Serum. Serum 4 (25. Nov.)	Dasselbe, Kochsalzlösung und Serumischung α wie in Tabelle XIII	
0,05	0,2	sehr stark
0,01	0,2	dgl.
0,005	0,2	"
0,001	0,2	stark
0,0005	0,2	"
0,05	—	sehr stark
0,01	—	dgl.
0,005	—	"
0,001	—	stark
0,0005	—	mäßig stark

Eine Erklärung dieser Differenz vermag ich nicht zu geben. Ich will nur erwähnen, daß ähnliche Differenzen der anticytotropischen Wirkung, wenn auch nicht so deutlich, bei den früher erwähnten Versuchen mit Serum 175 bei Benutzung verschiedener hämotropischer Immunsere ebenfalls beobachtet wurden.

Solche Tatsachen beweisen, wie außerordentlich kompliziert hier die Dinge liegen müssen und wie vorsichtig man auf diesem Terrain Schritt für Schritt vorzugehen hat.

Diese eben beschriebene Hemmungswirkung hat eine vollkommene Ähnlichkeit mit jener der sogenannten antagonistischen Substanzen, welche von Pfeiffer und Friedberger¹⁾ entdeckt worden sind. Es handelt sich hier um ein noch nicht ganz aufgeklärtes Phänomen, über welches später auch Sachs²⁾, Bordet und Gay³⁾ bei Benutzung hämolysischer Sera gearbeitet haben.

Ueber die Natur der antagonistischen Substanzen wissen wir gar nichts und auch sehr wenig darüber, wie ihre Wirkung zustande kommt. Es scheint nach den neuen Versuchen von Bordet und Gay, daß es sich wesentlich um kolloidale Substanzen des Serums handelt, welche irgendwie das Herantreten des Komplementes an die mit Ambozeptor beladenen Blutkörperchen hindern.

Nehmen wir an, daß diese Bordetsche Erklärung auch auf die anticytotropischen Wirkungen sich übertragen läßt, so würde daraus ein wichtiger Einwand herzuleiten sein gegen die Auffassung Neufelds, daß die Hämotropine der Mitwirkung komplementartiger Substanzen nicht bedürfen.

Jedenfalls beruht die antagonistische Wirkung gegenüber den Cytotropinen nicht etwa auf einer Behinderung der Bindung der Tropine an

1) Dtsche med. Wochenschr. 1905. p. 6.

2) Dtsche med. Wochenschr. 1905. p. 705.

3) Ann. de l'Inst. Pasteur. 1908. No. 8.

die roten Blutkörperchen und auch nicht auf einer Schädigung der Leukocyten. Es geht dieses aus der Tabelle XV hervor.

Tabelle XV.

Phagocytose nach 1 Stunde bei 37°			
Hämotropisches Immunserum. Ser. 6 (12. Nov.) inaktiviert	Serum 175 (altes Coli-Kaninchen- serum) vergl. Tab. VIII u. IX		
0,1	0,1	sehr stark	1. Zuerst Versuchsanordnungen wie in Tabelle I
0,05	0,1	dgl.	2. Nach 30 Min. bei 37° werden die Röhr- chen 1 und 2 abzentrifugiert
0,1	0,1	0	3. Die obenstehende Flüssigkeit wird ab- gegossen u. durch Kochsalzlös. ersetzt
0,05	0,1	0	4. Die 4 Röhrchen bleiben dann weiter 60 Min. bei 37°

In diesem Versuche wurden cytotropische Immunsera, rote Blutkörperchen und Leukocytenemulsion gemischt, das Gemisch dann 30 Min. bei 37° gehalten. Ein Teil davon wurde dann noch 1 Stunde bei Brut-schranktemperatur weiterbeobachtet. Hier fehlte, wie zu erwarten war, die Phagocytose vollständig.

Die zweite Hälfte des Gemisches wurde nach 30 Minuten bei 37° zentrifugiert, dadurch rote Blutkörperchen und Leukocyten vom Rest-serum befreit und in physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmt und dann wiederum 1 Stunde bei 37° gehalten. Hier trat nachträglich eine sehr starke Phagocytosis hervor. Es wird so bewiesen, daß das zu-gesetzte Serum 175 weder die Sensibilisierung der Erythrocyten durch die Cytotropine hemmen konnte, noch die Lebenseigenschaften der Leukocyten ungünstig beeinflusst hatte, denn anderenfalls hätte man auch hier nach der Zentrifugierung ein Ausbleiben der Phagocytose beobachten müssen.

Aus allen diesen Tatsachen sehen wir, daß man die antagonistischen Substanzen auch bei Feststellung von hämotropischen Effekten keines-falls vernachlässigen darf, und daß eine derartige Vernachlässigung zu Fehlschlüssen führen kann.

Aus dem Umstande, daß bei verschiedenen Tieren derselben Species sowohl als auch bei einem und demselben Tiere zu verschiedenen Zeiten das Verhältnis zwischen cytotropischen und anticytotropischen Substanzen ein variables sein kann, könnte es sich erklären, daß nicht in allen Fällen ein absoluter Parallelismus der hämolytischen und cytotropischen Kurve beobachtet wird.

Es müßten derartige Versuche unter Anwendung der von mir an-gegebenen Versuchsmethode bei Benutzung sensibilisierter, aber nachher von Serum befreiter Blutkörperchen wiederholt werden.

Eine kurze Besprechung verdienen auch die Versuche von Barrat¹⁾ und Hectoen²⁾, über welche Neufeld berichtet. Barrat glaubt, gezeigt zu haben, daß Tauben, welche mit Hühnerblut vorbehandelt worden waren, nur Cytotropine, nicht aber Hämolsine bilden. Ich habe zwar nicht die Arbeit im Original lesen können, allein ich möchte doch die Vermutung aussprechen, daß es sich hier vielleicht nicht um einen Mangel an Hämolsinen gehandelt haben dürfte, sondern daß möglicher-

1) Zitiert bei Neufeld und Bickel.

2) Zitiert bei Neufeld und Bickel.

weise bei diesen Versuchen ein geeignetes Komplement gefehlt habe, was bei Benutzung von Vogelseris nicht selten ist.

Hectoens verwendete das Serum eines Kaninchens, welches mit Ziegenblutkörperchen vorbehandelt worden war. Er behauptete, daß nach Absorption dieses Serums mit Schafblutkörperchen zwar die Hämolsine, nicht aber die Cytotropine für Ziegenblutkörperchen verschwinden. Die Behauptung Hectoens steht im Widerspruche mit den Tatsachen, die wir durch die grundlegenden Arbeiten von Ehrlich und Morgenroth kennen, nach welchen auch nach Absorption eines derartigen Serums mit Schafblutkörperchen die Hämolsine für Ziegenblutkörperchen erhalten bleiben.

Obwohl es hiernach überflüssig erscheinen könnte, den Versuchen Hectoens Bedeutung beizumessen, so habe ich dennoch nicht umhin gekonnt, eine Wiederholung des Versuches Hectoens anzustellen. Ich konnte mich hier überzeugen, daß zwar die Angabe Hectoens richtig ist, daß nach Absorption mit Schafblutkörperchen die cytotropische Wirkung des Serums für Ziegenblutkörperchen erhalten bleibe, freilich aber, was für mich schon von vornherein feststand, übte ein derartiges Serum auch entsprechende hämolytische Wirkung auf Ziegenblut aus.

Es erübrigt noch, die Versuche Neufeld und Töpfers¹⁾ zu besprechen, welche an einem durch Vorbehandlung mit Meerschweinchenblut gewonnenen Kaninchenimmunserum gemacht worden sind. Während diese Autoren bei einem derartigen Serum nur das Vorhandensein von Hämolsinen, nicht aber von Cytotropinen konstatieren konnten, hat Savtschenko²⁾, im Gegensatz dazu, unter Anwendung derselben Versuchsbedingungen eine starke Phagocytose beobachten können. Neufeld und Töpfer glauben, daß diese Verschiedenheit in den Resultaten nur auf eine individuelle Verschiedenheit der Versuchstiere zu beziehen sei.

Ich habe in Wiederholung dieser Versuche dem Kaninchen 173 $\frac{1}{2}$ ccm gewaschener Meerschweinchenblutkörperchen intravenös eingespritzt und sein Serum auf hämolytische und cytotropische Wirkung geprüft. Meine Resultate stimmen mit denen von Neufeld und Töpfer überein. Das so gewonnene Serum entfaltet eine hämolytische Wirkung, wenn ein passendes Komplement benutzt wird, dagegen blieb eine solche aus, wenn Meerschweinchenkomplement verwendet wurde. Dasselbe Serum zeigt sich bei Zusatz von Meerschweinchenleukocyten und Erythrocyten als hämotropisch unwirksam. Doch glaube ich, mich nicht den Schlußfolgerungen Neufelds anschließen zu sollen. Könnte es nicht vielleicht möglich sein, daß das Fehlen der Phagocytose nur gegenüber gewissen Leukocytenarten statthat und daß bei Anwendung von Leukocyten anderer Tierarten doch eine cytotropische Wirkung zu konstatieren wäre?

Es scheint, als ob von den auf dem Felde der Tropine arbeitenden Autoren bisher zu einseitig die Serumssubstanzen berücksichtigt worden sind; meiner Meinung nach muß man aber auch auf die beiden anderen Faktoren, die Leukocyten und die besonderen Eigenschaften der für die Versuche benutzten Erythrocyten achten.

Jeder, der auch nur wenige Phagocytoseversuche angestellt hat, muß mir zustimmen, wenn ich behaupte, daß zwischen der jeweiligen Wirkung der Leukocyten bei konstanten übrigen Versuchsbedingungen oft eine große Verschiedenheit zu konstatieren ist. Es genügt mir, diese

1) Centralbl. f. Bakteriöl. etc. Abt. I. Orig. Bd. XXXVIII. p. 456.

2) Ann. de l'Inst. Pasteur. 1902.

Tatsache einfach zu erwähnen. Eine nicht zu vernachlässigende Größe sind wohl auch die roten Blutkörperchen, welche sowohl im Normalzustande wie auch nach der Behandlung mit Immunseris ein verschiedenes Verhalten in bezug auf die Phagocytose, je nach der Art der angewandten Leukocyten zeigen können.

Auch eine schon mäßige Agglutination der roten Blutkörperchen kann eine deutliche Verminderung der Phagocytose bedingen.

Betrachten wir, wie viel Versuchsfehler bei Phagocytoseversuchen möglich sind, so verstehen wir, wie vorsichtig wir sein müssen, um aus derartigen Resultaten zu weitgehende Schlußfolgerungen zu ziehen!

Fasse ich meine Resultate zusammen, so glaube ich, daß nach diesen Untersuchungen feststeht, daß bis jetzt kein einwandsfreier Beweis für eine Verschiedenheit der Hämolytine und der Cytotropine gegeben worden ist. Andererseits haben freilich meine Versuche keinen direkten Beweis für ihre tatsächliche Identität geliefert.

Meinem hochverehrten Lehrer, Herrn Geheimrat Prof. Dr. R. Pfeiffer, beehre ich mich für die gütige Förderung und das liebenswürdige Interesse an meiner Arbeit meinen herzlichsten und ergebensten Dank auszusprechen.

Nachdruck verboten.

Zur Antitoxinfrage bei der Dysenterie.

[Aus dem Königl. Hygienischen Institut der Universität Königsberg i. Pr. (Direktor Geheimrat Prof. Dr. R. Pfeiffer).]

Von **R. Pfeiffer** und **E. Ungermann**.

Durch die Untersuchungen zahlreicher Autoren ist festgestellt, daß die Shigaschen Dysenteriebakterien für gewisse Versuchstiere, besonders für das Kaninchen, außerordentlich toxisch sind. Es ist bekannt, daß diese toxischen Substanzen wesentlich den Bakterienleibern anhaften, in diesen jedenfalls in hoher Konzentration vorhanden sind, während die Frage noch strittig ist, ob dieses Kaninchengift der Ruhrbacillen als ein Endotoxin aufzufassen ist, also wesentlich durch den Zerfall der Bacillen frei wird, oder als ein Toxin, welches nach Analogie des Tetanus- und Diphtheriegiftes durch aktive Lebenstätigkeit der Mikroorganismen sezerniert wird. Gegen die letztere Annahme, die besonders von Kraus und Doerr vertreten wird, scheinen uns gewichtige Bedenken zu bestehen, die der eine von uns, R. Pfeiffer, in seinem Vortrage auf der Mikrobiologenversammlung 1908 „Ueber die Beziehungen der sogenannten Endotoxine zu den Toxinen“ eingehend dargelegt hat; die wichtigsten Punkte seien hier kurz rekapituliert.

Lebende oder vorsichtig abgetötete Ruhragarkulturen töten Kaninchen bei intravenöser Einspritzung schon in einer Dosis, die erheblich unter einer Oese = 2 mg gelegen ist, und zwar unter ganz typischen Vergiftungserscheinungen, eine Tatsache, die im Laufe dieser Arbeit nochmals experimentell bestätigt werden wird. Derselbe Symptomenkomplex läßt sich erzeugen, wenn man ältere Bouillonkulturen der Shigaschen Dysenteriebakterien injiziert oder die Waschwasserflüssigkeit junger Massenkulturen von Dysenteriebacillen, aber, und das ist von den Autoren, welche an der Sekretion des Ruhrgiftes festhalten, niemals ge-

bührend berücksichtigt worden, in Dosen, welche sehr erheblich, bis um das 100-fache, größer sind, als die Dosis letalis minima der abgetöteten Dysenterievollbakterien. Charakteristisch ist auch, daß bei dem Bouillongift die Toxizität der Filtrate aus jungen Kulturen, solange sich die Dysenteriebakterien noch lebhaft vermehren, sehr gering ist und erst allmählich steigt in demselben Verhältnis, wie die Bakterienleiber der Mazeration und autolytischen Zerstörung anheimfallen. Das alles sind Tatsachen, welche uns gegen die Sekretionshypothese zu sprechen scheinen. Wie dem auch sei, es kam uns in dieser Arbeit wesentlich darauf an, die Wirkung eines als antitoxisch bezeichneten Dysenterieserums, welches uns von Kraus in Wien in der lebenswürdigsten Weise zur Verfügung gestellt worden war, auf die verschiedenen Gifte der Ruhrbakterien zu studieren.

Wir begannen damit, daß wir die tödliche Minimaldosis der bei 56° C abgetöteten, auf ihre Sterilität geprüften 24-stündigen Dysenterieagarkulturen auf Kaninchen von ca. 1400 g Gewicht bei intravenöser Einverleibung ermittelten. Die betreffende Kultur verdanken wir gleichfalls der Freundlichkeit von R. Kraus.

Aus Tab. I geht hervor, daß die tödliche Dosis jedenfalls weniger als 1 Oese = 2 mg beträgt, des weiteren, daß die Kaninchen individuell außerordentlich verschieden reagieren; so starb ein Kaninchen, welches nur $\frac{1}{10}$ Oese = $\frac{1}{5}$ mg Kultur erhalten hatte, an toxischer Ruhrvergiftung. Allerdings war dieses Tier das leichteste von allen und litt gleichzeitig an Coccidiose. Auch die Kaninchen, welche mit dem Leben davongekommen waren, ließen durch beträchtliche Gewichtsverluste erkennen, daß sie unter dem Gifteinfluß gestanden hatten.

Tabelle I.

24-stündige Dysenterieschrägagarkultur. 1 Stunde bei 56° C abgetötet.

		16. Juli	17. Juli	18. Juli	19. Juli	20. Juli	21. Juli
Kaninchen No. 11	1450 g	1 Oese (= 2 mg) Kultur in 1 ccm Kochsalz- lösung intra- venös	Sym- ptomlos 1350 g	Parese der vorderen Ex- tremitäten u. der Nacken- muskeln	Schwere Parese beider Ex- tremi- täten- paare	Exitus in voll- komme- ner Läh- mung	—
Kaninchen No. 10	1400 g	$\frac{1}{2}$ Oese Kul- tur in 1 ccm Kochsalz- lösung intra- venös	Sym- ptomlos 1300 g	Symptomlos	Sym- ptomlos	Sym- ptomlos 1200 g	—
Kaninchen No. 9	1300 g	$\frac{1}{5}$ Oese Kul- tur in 1 ccm Kochsalz- lösung intra- venös	Sym- ptomlos 1300 g	Symptomlos	Sym- ptomlos	Sym- ptomlos 1150 g	—
Kaninchen No. 12	1250 g	$\frac{1}{10}$ Oese Kul- tur in 1 ccm Kochsalz- lösung intra- venös	Sym- ptomlos 1200 g	Symptomlos	Leichte Parese der vorderen Extremi- täten	Paresen sind zu- rückge- gangen; munter 1100 g	Exitus a. 21. Juli, starke Coccidiose

Tab. II gibt die Resultate von Versuchen, den Einfluß zu ermitteln, welchen Normalpferdeserum auf die Vergiftung mit Ruhrbakterien ausübt; wir stellten fest, daß selbst 3 ccm Normalpferdeserum mit $\frac{1}{2}$ Oese = 1 mg gemischt intravenös injiziert, absolut ohne jeden Einfluß auf den

typischen Ablauf der Intoxikation ist, also keinerlei antitoxische Eigenschaften besitzt.

Tabelle II.

42-stündige Dysenteriekultur, 1 Stunde bei 56° C abgetötet. Kultur mit Pferdenormalserum gemischt, intravenös.

Kaninchen No. 33	1900 g	1/2 Oese Kultur und 1 ccm Normal- pferdeserum	Symptomlos	—	—	Bewegt sich etwas langsamer	Ge- sund	Ge- sund
Kaninchen No. 31	1750 g	1/2 Oese Kultur und 2 ccm Normal- pferdeserum	Leichte Paresen	Allgemeine Parese	Exitus völlig ge- lähmt	—	—	—
Kaninchen No. 32	1750 g	1/2 Oese Kultur und 3 ccm Normal- pferdeserum	Fortschrei- tende Pa- resen	Totale Lähmung Exitus	—	—	—	—

Dagegen kommen dem Krausschen Serum tatsächlich deutliche, wenn auch schwache antitoxische Eigenschaften gegenüber dem Kaninchen- gift der Shiga-Bacillen zu (s. Tabelle III).

Tabelle III.

24-stündige Kultur, 1 Stunde bei 56° C abgetötet, mit der entsprechenden (auf 2 ccm aufgefüllten) Serumquantität gemischt intravenös injiziert.

		31. Aug.	1. Sept.	2. Sept.	3. Sept.	4. Sept.	5. Sept.	6. Sept.
Kaninchen No. 35	1350 g	1 Oese Kultur + 1 ccm Dysen- terieserum (+ 1 ccm NaCl)	Sym- ptomlos	—	—	—	—	Gesund 1150 g
Kaninchen No. 36	1350 g	1 Oese Kultur + 0,3 ccm Dysen- terieserum (+ 1,7 ccm NaCl)	Sym- ptomlos	—	—	—	—	Gesund 1200 g
Kaninchen No. 37	1350 g	1 Oese Kultur + 0,1 ccm Dysen- terieserum (+ 1,9 ccm NaCl)	Be- ginnende Parese	Exitus in völliger Lähmung	—	—	—	—
Kaninchen No. 38	1500 g	1 Oese Kultur + 0,05 ccm Dys- enterieserum (+ 1,95 ccm NaCl)	Schwere Paresen Exitus	—	—	—	—	—
Kaninchen No. 42	1200 g	3 Oesen Kultur + 3 ccm Dysen- terieserum	Sym- ptomlos	—	—	—	Gesund 1100 g	—
Kaninchen No. 43	1200 g	5 Oesen Kultur + 5 ccm Dysen- terieserum intra- venös	Sym- ptomlos	—	—	—	Gesund 1150 g	—

Wir sehen, daß die Tiere eine etwa doppelt letale Dosis vertrugen, wenn die toten Shiga-Bacillen mit entsprechenden Mengen des Immuns- erums (bis zu 0,3 ccm herab) gemischt intravenös injiziert wurden, aller- dings auch nicht völlig reaktionslos, wie die erhebliche Gewichtsabnahme der Versuchskaninchen bewies. Kleinere Serumdosen von 0,1 ccm und darunter waren ohne Effekt. Bei dieser antitoxischen Wirkung trat auch das Gesetz der Multipla deutlich hervor, indem im Versuch No. 42 und 43 die 6-fache und sogar 10-fache tödliche Dosis neutralisiert werden konnte.

Soweit stehen unsere Versuche mit den Angaben von Kraus und anderen Autoren in Harmonie.

Ganz unerwartet negative Resultate erhielten wir jedoch, als wir versuchten, mit dem Krausschen Serum das Gift der Shiga-Bacillen im Reagensglas abzusättigen. Wir gingen so vor, daß wir frische, bei 56° C abgetötete Dysenterieagarkulturen mit wechselnden Dosen des Krausschen Serums mischten und dann entweder 2 Stunden bei Zimmertemperatur oder in einigen Versuchen 1 Stunde bei 37° C unter häufigem Umschütteln stehen ließen und dann abzentrifugierten. Zu unserem größten Erstaunen starben sämtliche Tiere, denen die so vor-

Tabelle IV.

24-stündige Dysenteriekultur. 1 Stunde bei 56° C abgetötet. Je 1 Oese aufgeschwemmt in 2 ccm, 4 ccm, 6 ccm Dysenterieserum. Die Mischung blieb 1 Stunde bei 37° C unter häufigem Umschütteln. Dann zentrifugiert. Der Bodensatz in Kochsalzlösung aufgeschwemmt und intravenös injiziert.

		30. Juli	31. Juli	1. Aug.	2. Aug.	3. Aug.	4. Aug.	5. Aug.
Kaninchen No. 20	1800 g	Bodensatz von 2 ccm Dysenterieserum (= 1 Oese) intravenös	Krank, beginnende Parese	völlig gelähmt Exitus	—	—	—	—
Kaninchen No. 21	1700 g	Bodensatz (= 1 Oese) aus 4 ccm Dysenterieserum intravenös	Symptomlos	Beginnende Paresen 1550 g	Totale Parese Exitus	—	—	—
Kaninchen No. 19	1520 g	Bodensatz (= 1 Oese) aus 6 ccm Dysenterieserum intravenös	Symptomlos	Symptomlos 1400 g	—	Leichte Parese der vorderen Extremitäten	Vordere u. hintere Extremitäten paretisch. Exitus	—

7 Oesen totor 24-stündiger Dysenteriekultur in 4 ccm Kochsalzlösung verrieben. 2 ccm der Suspension mit 2 ccm Dysenterieserum 2 Stunden bei Zimmertemperatur unter öfterem Umschütteln; zentrifugiert. Der Rückstand (= 3 1/2 Oesen) in 3 1/2 ccm Kochsalzlösung verrieben. Intravenöse Injektion.

		28. Juli	29. Juli	30. Juli	31. Juli	1. Aug.		
Kaninchen No. 17	1400 g	2 cm der Rückstandaufschwemmung (= 2 Oesen) intravenös	etwas matt	Hinterbeine paretisch	Allgem. Parese, aber nicht gelähmt 1050 g	Exitus	—	—
Kaninchen No. 14	1350 g	1 ccm der Rückstandaufschwemmung (= 1 Oese) intravenös	Leichte Parese, plötzlicher Exitus	—	—	—	—	—
Kaninchen No. 13	1350 g	1/2 ccm der Rückstandaufschwemmung (= 1/2 Oese) intravenös	Leichte Parese der vorderen Extremitäten	Exitus	—	—	—	—

behandelten Bakterien injiziert wurden (Tab. IV); selbst sehr große Mengen des Immunserums, die zwischen 2 und 6 ccm schwankten, zeigten sich als unfähig auch nur die doppelte oder sogar die einfache Dosis letalis der abgetöteten Shiga-Bacillen irgendwie zu beeinflussen. Das Gift, welches bei Gegenwart des antitoxischen Serums im Tierkörper prompt neutralisiert wurde, zeigte außerhalb des Tierkörpers im Reagensglas keinerlei Affinität zu den spezifischen Serumsstoffen.

Wir veröffentlichen die Tatsache als solche, sind aber zurzeit außerstande, eine zureichende Erklärung dafür abzugeben. Man könnte daran denken, daß das Toxin im Inneren der Bakterienzelle gegen das Antitoxin rein mechanisch geschützt ist, und es würde dies dann als ein prägnanter Beweis für die Endotoxinnatur desselben gelten können. Andererseits wäre es möglich, daß das Antitoxin überhaupt nicht direkt aufs Toxin, sondern indirekt durch die Konkurrenz des Organismus wirkt, was allerdings bei echten Toxinen und Antitoxinen bisher noch niemals beobachtet worden ist.

Auch für Meerschweinchen haben die Ruhrbacillen bei intraperitonealer Injektion deutliche Giftwirkungen. Allerdings fehlen die außerordentlich charakteristischen Lähmungssymptome, wie sie beim Kaninchen das Vergiftungsbild geradezu beherrschen. Wir finden beim Meerschweinchen hauptsächlich eine mehr oder weniger deutliche Hypothermie, die allerdings auch in tödlich verlaufenden Fällen niemals einen so rapiden und tiefgehenden Temperatursturz hervorruft, wie beispielsweise das Choleragift und das Typhusgift. Die Tiere magern dabei sehr erheblich ab und fühlen sich schlaff an. Die Obduktionsbefunde der gestorbenen Tiere sind wesentlich negativ; stärkere Entzündungserscheinungen in der Bauchhöhle fehlen meist, auch von den bei Kaninchen so häufig zu beobachtenden Blutungen in der Dickdarmschleimhaut ist beim Meerschweinchen nichts zu bemerken. Die tödliche Minimaldosis für die von uns benutzten Meerschweinchen von 230 g Gewicht lag etwa bei 10 mg, während 15 mg die Meerschweinchen in der Regel töteten. Nur ein Kontrolltier, welches vor der Gifteinspritzung 5 ccm Pferdeserum subkutan erhalten hatte, kam nach Einspritzung von 15 mg der toten Bakterien mit dem Leben davon.

Die Zahl der Versuche mit Dysenterieserum (Tab. IV) ist leider nicht sehr groß, da die uns zur Verfügung stehende relativ geringe Serumquantität eine weitere Ausdehnung der Versuche nicht erlaubte. Doch geht so viel daraus hervor, daß selbst 5 ccm Dysenterieserum, welches 4 Stunden vor der Giftinjektion über verschiedene Stellen des Körpers verteilt (um die Resorption zu beschleunigen) subkutan eingespritzt worden war, auf 20 mg der sterilisierten Kultur, also das noch nicht einmal 2-fache der tödlichen Dosis für Meerschweinchen absolut ohne jede Wirkung war. Nicht einmal die eben sicher tödliche Dosis von 15 mg wurde völlig neutralisiert, da 2 von 3 Versuchstieren zwar am Leben blieben, aber ein krankes Aussehen, Schlaffheit, starke Temperaturabsenkung und erhebliche Gewichtsabnahme aufwiesen. Wir finden also auch hier wieder die schon von den Untersuchungen über das Choleragift bekannte Tatsache bestätigt, daß das Immunserum einen sehr begrenzten, aber doch die Vergiftung etwas stärker hemmenden Einfluß als das Normalserum besitzt, ohne daß jedoch echt antitoxische Einflüsse dabei eine Rolle spielen. Der Einwand, daß die von uns verwendete Serumquantität unzureichend gewesen sei, wird durch die folgende kleine Rechnung widerlegt: Das in 2 mg Shiga-Kultur enthaltene Kaninchengift wird, wie oben gezeigt, durch 0,3 ccm antitoxischen Serums

Tabelle V.

Bestimmungen der tödlichen Dosis abgetöteter Dysenteriekultur für Meerschweinchen. 24-stündige Plattenkultur, mit Spatel abgenommen, feucht gewogen, in Kochsalz suspendiert, so daß in 1 ccm = 10 mg enthalten sind. 1 Stunde bei 56° abgetötet. intraperitoneale Applikation.

w.	230 g	0,5 ccm = 5 mg	7 Uhr 36,3	Munter	36,9	37,6	—	—
0	37,7	Kultur	2 " 37,8	37,4		210 g		
		36,9	7 " 38,0	195 g				
w.	220 g	1,0 ccm = 10 mg	7 " 37,2	7 Uhr 36,5	38,9	39,5	38,6	—
2	38,5	Kultur	2 " 36,8	2 " 37,3	150 g		143 g	
		37,2	7 " 36,2	7 " 37,8				
w.	210 g	1,0 ccm = 10 mg	7 " Exitus					
27	37,8	Kultur	2 " "					
		35,8	7 " "					
w.	225 g	1,5 ccm = 15 mg	7 " 35,8	Exitus				
31	37,7	Kultur	2 " 35,5	164 g				
		36,3	7 " 35,9					
w.	210 g	1,5 ccm = 15 mg	7 " 35,1	7 Uhr 36,3	schwer krank	Exitus		
26	37,6	Kultur	2 " 36,5	162 g	Darmprolaps			
		37,6	7 " 36,8					
hw.	230 g	2,0 ccm = 20 mg	7 " 38,2	7 Uhr 37,8	Exitus			
53	38,6	Kultur	2 " 37,9	2 " 36,5	175 g			
		38,0	7 " 38,3	7 " 35,6				

Bestimmung des Einflusses von Normalpferdeserum auf die Vergiftung von Meerschweinchen mit Dysenteriekultur. (Das Serum wurde an mehreren Stellen subkutan 4 Stunden vor Einspritzung der Kultur injiziert.)

hw.	245 g	5 ccm Normalser.	7 Uhr 36,1	7 Uhr 38,0	37,5	—	—	gesund
67	37,6	nach 4 Std.	2 " 35,8	2 " 37,8	185 g			
		15 mg Kultur	7 " 35,4	7 " 36,9				
hw.	240 g	5 ccm Normalser.	7 " 38,0	7 " 35,8	Exitus			
61	37,6	nach 4 Std.	2 " 36,2	2 Uhr unter 35				
		15 mg Kultur	7 " 36,0	7 " " 35				
hw.	230 g	5 ccm Normalser.	7 " 35,0					
68	38,2	nach 4 Std.	2 " unter 35,0					
		15 mg Kultur	Exitus					
hw.	255 g	5 ccm Normalser.	7 Uhr 36,2	8 Uhr unter 35				
70	37,8	nach 4 Std.	2 " 35,8	12 " " 35				
		20 mg Kultur	7 " 35,4	Exitus				

Tabelle VI.

Prüfung des Einflusses des Krausschen Dysenterieserums auf die Vergiftung von Meerschweinchen mit Dysenteriekultur.

Dysenteriebakterienaufschwemmung in Kochsalz 1 ccm = 20 mg, 1 Std. bei 56°. 4 Std. vor Injektion der Kultur 5 ccm Dysenterieserum an mehreren Stellen subkutan.

Meerschw.	235 g	5 ccm Dysenterieserum	7 Uhr 35,3	7 Uhr 37,4	37,9	—	gesund
No. 56	37,4	nach 4 Std.	2 " 35,5	2 " 38,3	185 g		
		15 mg Kultur	7 " 35,8	7 " 38,0			
Meerschw.	245 g	5 ccm Dysenterieserum	7 " 37,4	7 " 39,2	38,2	—	gesund
No. 69	36,9	nach 4 Std.	12 " 36,0	12 " 39,0	190 g		
		15 mg Kultur	7 " 36,3	7 " 38,6			
Meerschw.	230 g	5 ccm Dysenterieserum	7 " 35,6				
No. 60	37,3	nach 4 Std.	2 " 35,2				
		15 mg Kultur	Exitus				
Meerschw.	235 g	5 ccm Dysenterieserum	7 Uhr 36,4	7 " 35,4	7 Uhr 35,2		
No. 71	37,8	nach 4 Std.	2 " 35,4	2 " 35,2	" 35,0		
		20 mg Kultur	7 " 35,6	7 " 35,6	Exitus		

neutralisiert. Für 20 mg würden also 3 ccm Serum zur Neutralisation ausreichen müssen, während wir tatsächlich 5 ccm Serum verabfolgt haben. Allerdings wurde bei den Kaninchen das Serum mit der Kultur

gemischt injiziert, während wir es bei den Meerschweinchenversuchen getrennt verabreichten. Jedoch ist dieser Abänderung der Versuchsbedingungen schwerlich eine gar zu große Bedeutung zuzuerkennen, mit Rücksicht darauf, daß die Giftdosen die Dosis letalis minima nur wenig übertrafen. Eine auch noch so geringe echt antitoxische Wirkung hätte sich durch Ueberleben der Tiere sicher verraten müssen. Wir dürfen aus unseren Versuchen am Meerschweinchen folgern, daß das Kaninchengift vom Meerschweinchengift verschieden sein muß. Gegen das erstere existiert ein Antitoxin, gegen das zweite dagegen nicht, wenigstens nicht in dem Krausschen Dysenterieserum.

Es erhebt sich nun die praktische wichtige Frage, welches dieser beiden Ruhrgifte für die Menschenpathologie in Betracht kommt. Betrachten wir den klinischen Verlauf der Ruhr, so finden wir keinerlei Symptome, welche auf die Wirkung eines Lähmung erzeugenden Giftes analog dem Kaninchengift hindeuten. Als wesentliche pathologisch-anatomische Grundlage der Ruhr ist eine starke, bis zur Nekrose fortschreitende Entzündung der Schleimhaut des Dickdarmes, die aber keinesfalls auf die Fernwirkung eines in den Organismus aufgenommenen löslichen Giftes zu beziehen ist, sondern als toxischer Effekt der lokal in der Schleimhaut sich ansiedelnden und dort im Kontakt mit dem lebenden Gewebe zugrundegehenden Dysenteriebacillen aufzufassen ist. Daß diese Auffassung richtig ist, beweist schlagend die Existenz der Flexner-Ruhr, wobei, wie Kraus selbst zugeben muß, lösliche, für das Kaninchen spezifische Gifte überhaupt nicht in Betracht kommen können.

Ueberzeugender aber als derartige theoretische Raisonsnements sprechen im selben Sinne einige Versuche am Menschen, zu denen die Herren Dr. Ungermann, Dr. Schidorski und Dr. Doepner sich freiwillig erbieten haben. Herr Dr. Ungermann, welcher als Kontrolle diente, injizierte sich subkutan 2 mg abgetöteter Ruhrkultur, die Herren Schidorski und Doepner erhielten 2 resp. 3 mg mit 1 resp. 1,5 ccm Krausschem Serum gemischt nach 15 Minuten langem Stehen ebenfalls subkutan eingespritzt.

Der Verlauf war folgender:

U.

10 Uhr 30 Min.	Injektion.	36,6.	
2 " 30 "		36,8	
4 " — "		37,4	Injektionsstelle geschwollen, leicht schmerzhaft.
6 " — "		37,6	Leichte Fiebersymptome; Schmerzhaftigkeit der betreffenden Axillardrüse.
8 " — "		38,1	
10 " — "		38,0	
11 " — "		38,0	

Nach starkem Schweiß morgens 36,9. Wohlbefinden, Injektionsstelle bei mäßiger Schwellung noch etwa 1 Woche schmerzhaft.

Sch.

11 Uhr 30 Min. Injektion. (2 mg Kultur + 1 ccm Krausschen Serums.)

		36,3	
3 " — "		36,3	
4 " 30 "		36,5	Leichte Schmerzhaftigkeit der Injektionsstelle.
6 " — "		36,8	
6 " 30 "		36,8	
8 " — "		37,0	

Morgens 36,3. Wohlbefinden.

Schwellung und Schmerzhaftigkeit der Injektionsstelle gehen bald zurück.

D.

11 Uhr. Injektion. (3 mg Kultur + 1,5 ccm Krausschen Serums.)

		36,7
3 " "		37,2

- 4 Uhr 37,8
 6 „ 38,0 Kopfschmerz, starkes Uebelbefinden.
 8 „ 38,1 Schwellung der Injektionsstelle vom Darmbeinkamm bis zum Rippenbogen. Schmerzhaftigkeit der Axillardrüse.
 10 „ 38,0
 Morgens 37,6. Nachts starker Schweiß. Die Schwellung der Injektionsstelle erhielt sich etwas über 1 Woche.

Wir sehen also, daß das Kraussche antitoxische Serum weder die lokalen noch die allgemeinen Giftwirkungen derartig minimaler Dosen der abgetöteten Ruhrbacillen für den Menschen irgendwie zu beeinflussen vermag, obwohl die Bedingungen für die antitoxische Wirkung so günstig wie möglich gewählt worden waren.

Ob unter diesen Umständen bei der Dysenterie mit einer antitoxischen Wirkung des Krausschen Serums ernsthaft zu rechnen ist, muß bezweifelt werden. Wenn trotzdem, wie aus den Statistiken hervorzugehen scheint, das Dysenterieserum den Verlauf der Ruhr im günstigen Sinne beeinflußt, so ist das nicht auf ein darin enthaltenes Antitoxin, sondern auf dessen antiinfektiöse Eigenschaften zu beziehen.

Nachdruck verboten.

Ueber die bakteriolytischen Eigenschaften des Paratyphus-B-Immunserums.

[Aus dem Hygienischen Institut der Universität Königsberg i. Pr.
 (Direktor: Geheimrat Prof. Dr. R. Pfeiffer).]

Von Dr. Carlo Bezzola.

Die folgenden Untersuchungen wurden vorgenommen zur Prüfung der Frage, ob die Bakteriolytine und die Hämolytine einerseits und die Bakteriotropine und Cytotropine andererseits, wie Neufeld angibt, identische oder, wie andere Autoren annehmen, verschiedene Substanzen sind. Bei einer genaueren Prüfung der spezifischen Antikörper des Paratyphus-B-Immunserums habe ich Tatsachen gefunden, welche mit gewissen Angaben Neufelds im Widerspruch stehen. Neufeld und Hüne¹⁾ glauben gezeigt zu haben, daß Immunsera gegen Paratyphus B nur Bakteriotropine, nicht aber Bakteriolytine enthalten.

Wäre eine solche Behauptung wahr, so hätte sie eine große Bedeutung nicht nur für das Verständnis der Paratyphusimmunität, sondern auch in hohem Grade für die Lehre von der Immunität im allgemeinen. Es wäre auch in der Tat hierdurch ein außerordentlich schwerwiegender Beweis für die Behauptung Neufelds gegeben, nach welcher die Bakteriolytine und die Bakteriotropine verschiedenartige Immunsustanzen sein sollen. Es ist nun bemerkenswert, daß schon seit langer Zeit Tatsachen bekannt sind, welche mit dieser Neufeldschen²⁾ Annahme in striktem Widerspruche stehen. So beschreiben Conradi und Drigalski, sowie Jürgens eine durch Paratyphusimmunserum im Meerschweinchenperitoneum erzeugte und völlig unter dem Bilde des Pfeifferschen Phänomens verlaufende Bakteriolyse der Paratyphusbacillen. Der Ablauf des lytischen Prozesses wurde von ihnen im hängenden Tropfen beobachtet. Die erwähnten Autoren haben es für überflüssig gehalten, eine genau detaillierte Beschreibung in ihren Versuchs-

1) Arbeiten a. d. Kais. Ges.-Amt. Bd. XXV. 1907.

2) Zeitschr. f. Hyg. Bd. XLII. p. 141.

protokollen zu geben. Es geht aus den Protokollen jedoch hervor, daß die lytische Zerstörung der Bacillen in relativ kurzer Zeit erfolgt. Gewöhnlich genügt hierzu 1 Stunde. Mit diesen Angaben stimmen die Resultate von Kolle¹⁾, Kutscher und Meinicke²⁾ überein.

Kolle hat beobachtet, daß stark agglutinierende Sera, welche durch Immunisation mit Paratyphus, Mäusetyphus und Bacillus enteritidis gewonnen worden waren, alle drei genannten Bakterienarten wechselseitig beeinflussen, und daß dasselbe auch für die entsprechenden in den Seris enthaltenen bakteriolytischen Substanzen gilt. Kolle fügt hinzu, daß das Pfeiffersche Phänomen bei den untersuchten Kulturen besonders rasch und typisch eintritt. In Einklang damit hat auch Kutscher sich davon überzeugt, daß die Bakteriolyse des Paratyphusbacillus im Meerschweinchenperitoneum bei Verwendung starker Immunsera in sehr kurzer Zeit verläuft, und zwar unter typischer Granulabildung in Analogie mit der Bakteriolyse der Choleravibrionen, und jedenfalls viel schneller und stärker als bei den Typhusbacillen ausgesprochen ist.

Auch Töpfer und Jaffé³⁾ haben eine Bakteriolyse im lebenden Organismus konstatieren können. Nur in scheinbarem Widerspruch stehen damit die Versuche von Bonhoff⁴⁾, welcher zwar bei peritonealer Injektion der Paratyphusbacillen mit ihren Immunserumgemisch das Leben der infizierten Tiere bis auf 13 Tage zu verlängern vermochte, dem es aber nie gelungen ist, die Versuchstiere dauernd am Leben zu erhalten, da sie schließlich doch noch der Infektion erlagen. Er glaubt aber selbst, daß wohl ein totaler Schutz möglich sein dürfte mit Seris, die hochwertiger wären als jene, welche er selbst angewandt hatte. Auch Böhme⁵⁾, welcher ein Serum von sehr hohem Werte gegen Psittacosis benutzte, konnte durch dieses Serum bei Paratyphusinfektion nur eine Lebensverlängerung der Tiere hervorrufen, während dasselbe Serum eine sichere Schutzwirkung gegen Typhusbacillen ausübte.

Dieselben Resultate mit Paratyphusserum hatte auch Citron.

Alle Beobachter stimmen darin überein, daß eine deutliche bakteriolytische Beeinflussung der Paratyphusbacillen durch das Immunserum in der Bauchhöhle des Meerschweinchens zu beobachten ist; die Ansichten gehen nur bezüglich des Grades der Bakteriolyse auseinander; einige haben nur teilweise, andere totale Bakterienzerstörung beobachtet. Alle Autoren stimmen in dem Punkte überein, daß der bakteriolytische Vorgang beim Paratyphus viel mehr Ähnlichkeit in seinem Verlaufe mit der Bakteriolyse des Choleravibrio als mit jener des Typhus habe.

Diese Analogie besteht jedoch nur bei dem Versuche im Meerschweinchenperitoneum, nicht aber bei dem Reagensglasversuch.

Während eine Bakteriolyse für Cholera- und Typhusbacillen auch im Reagenzglase jederzeit sehr deutlich vorgeführt werden kann, gelingt sie bei Paratyphus nicht so leicht.

Töpfer und Jaffé, sowie Neufeld und Hüne, welche nach der Methode von Stern und Korte gearbeitet haben, konnten eine Reagensglasbakterizidie überhaupt nicht beobachten.

Gegen diese allgemein angenommene Ansicht spricht aber eine Beobachtung Laubenheimers⁶⁾, welcher bei drei klinischen Fällen von

1) Zeitschr. f. Hyg. Bd. LII. p. 287.

2) Ebenda. p. 301.

3) Ebenda. p. 393.

4) Arch. f. Hyg. Bd. L.

5) Zeitschr. f. Hyg. Bd. LII. p. 97.

6) Zeitschr. f. klin. Med. Bd. LVI.

Paratyphus mit dem Patientenserum im Reagensglase eine deutliche Bakteriolyse erhalten hat, und zwar in einem Falle so stark, daß schon eine Verdünnung des Serums von 1:51200 vollständige Bakteriolyse ergab.

Die Verschiedenheit der Angaben der Autoren über die Bakteriolyse bei Paratyphus veranlaßte mich, diese, meiner Meinung nach wichtige Frage einer eingehenden Prüfung zu unterziehen, besonders mit Rücksicht auf Neufelds Behauptung, daß im Paratyphusserum nur Bakteriotropine vorhanden seien, während bakteriolytische Substanzen fehlen sollen.

Ich habe für diese Versuche einen Paratyphus-B-Stamm benutzt, welcher die wohlbekannten morphologischen und kulturellen Eigenschaften des Paratyphus B zeigt.

Seit Monaten war dieser Stamm nicht durch den Tierkörper passiert worden und besaß daher eine verhältnismäßig geringe, aber sehr konstante, Virulenz, die beiläufig $\frac{1}{10}$ Oese für ein Meerschweinchen von ca. 250—300 g betrug. Die Wahl einer derartigen wenig virulenten Kultur hat nicht ihren Grund in Zufälligkeiten, sondern ist bestimmt worden durch den Wunsch, einen Stamm zu verwenden, dessen Virulenz während der Dauer der Experimente möglichst gleichförmig wäre. Als Immunserum benutzte ich das Serum eines Kaninchens, welchem ich dreimal in Intervallen von einer Woche $\frac{1}{10}$, $\frac{1}{5}$ und eine ganze Oese einer 18-stündigen Paratyphuskultur, welche 1 Stunde bei 60° erhitzt worden war, intravenös injiziert hatte. Der agglutinatorische Titer dieses Serums für meinen Stamm ist 1:800, der bakterizide Titer für eine Oese meiner Kultur für 250—300 g Meerschweinchen beträgt 5 mg.

Nach der Methode von Stern und Korte¹⁾, welche ich anfangs bei meinen Versuchen benutzt habe, war es mir durch vergleichende Kolonieenzählung nicht möglich, eine Bakteriolyse festzustellen. Dieses Resultat stimmt aber nicht mit Beobachtungen überein, die ich im hängenden Tropfen systematisch angestellt habe. Denn wenn ich genügende Mengen des Immunserums zu meinem Reagensglasversuche verwandte, so konnte ich schon nach 30 Minuten im hängenden Tropfen einige deutliche Degenerationsformen, dabei auch spärliche Granula, beobachten; freilich war ihre Zahl in meinen häufig wiederholten Versuchen stets sehr klein. Die Tatsache, daß nur eine so geringe Anzahl von Degenerationsformen zu sehen ist, erklärt es, daß man durch den Plattenzählversuch keine ausschlaggebenden Resultate erhalten kann. Ich konnte mich von der Existenz dieser Degenerationsformen auch im gefärbten Präparate überzeugen.

Da wir gesehen haben, daß die Anwendung der Stern und Korte'schen Technik für derartig geringe bakteriolytische Erscheinungen wenig beweiskräftig sich erweist, die mikroskopischen Untersuchungen hingegen bessere Resultate geben, so fiel damit die Notwendigkeit hinweg, lebende Bacillen zu benutzen, bei deren Anwendung wir stets mit einer unkontrollierbaren Vermehrung der Mikroben neben der Bakteriolyse rechnen müssen. Ich habe daher zu den folgenden Versuchen Paratyphusbacillen benutzt, die bei 60° oder mit Chloroform abgetötet worden waren, und habe die Bakterizidie nur mikroskopisch sowohl im hängenden Tropfen als auch im gefärbten Präparat beobachtet. Da immerhin die Vermutung naheliegt, daß durch eine derartige Behandlung der Bacillen allein ohne

1) Berliner klin. Wochenschr. 1904. No. 9.

Zusatz von Immunserum bereits eine Schädigung der Bakterienstruktur welche bakteriolytische Veränderungen vortäuscht, hervorgerufen werden kann, so waren zahlreiche Kontrollen notwendig, die ich selbstverständlich auch angestellt habe.

Bei dieser Versuchsanordnung finden sich Degenerationsformen in viel größerer Zahl vor, als in den Versuchen mit lebenden Bacillen, aber immerhin in sehr bescheidenen Grenzen im Vergleiche zu der Zahl der wohl erhaltenen Formen.

Wenn wir nun aus den Vorgängen im Reagensglas einen Schluß auf die Verhältnisse im Meerschweinchenperitoneum ziehen sollten, so würden wir mit Neufeld zu der Auffassung gedrängt, daß die therapeutische Wirkung des Immunserums in vivo nur zum geringsten Teil der Bakterizidie zuzuschreiben sei. Obzwar bereits Pfeiffer und später auch Neisser es immer wieder betont haben, daß der Reagensglasversuch auf die im lebenden Organismus sich abspielenden Vorgänge nur sehr bedingte Schlüsse erlaubt, so war doch dieses Mißverhältnis zwischen dem Reagensglasversuch und den früheren Erfahrungen im Tierkörper sehr auffällig.

Es schien mir interessant, zu untersuchen, was wohl die Ursache für ein derartiges Mißverhältnis sein dürfte. Was die Quantität der Bacillen und des Immunserums und die Versuchstemperatur anlangt, so muß es ja möglich sein, dieselben Bedingungen auch im Reagensglase zu schaffen, wie wir sie im lebenden Organismus vorfinden. Es war zunächst daran zu denken, daß die Komplementmenge, welche im Reagensglasversuch stets erheblich geringer sein muß, als im lebenden Peritoneum, die so auffällige Differenz des bakteriolytischen Effektes bedingt; deshalb haben bereits Töpfer und Jaffe¹⁾ versucht, die Reagensglasbakterizidie durch Vergrößerung der Komplementmengen zu steigern, was aber zu keinem besonderen Resultat geführt hat. Ich selbst konnte die Angaben dieser beiden Autoren vollständig bestätigen.

Infolgedessen lag die Vermutung nahe, daß die Komplementwirkung, welche in der Leibeshöhle des Meerschweinchens so leicht sich demonstrieren läßt, nicht allein quantitativ, sondern möglicherweise auch qualitativ von der Komplementwirkung des Meerschweinchenserums, dessen wir uns für die Reagensglasversuche bedienen, verschieden sei. Um diese Frage näher zu studieren, habe ich, behufs Gewinnung größerer

Tabelle I.

Meerschweinchen 62,200 g bekommt in das Peritoneum eingespritzt 0,05 l.-S + 1,5 ccm physiologische Kochsalzlösung.

Nach 35 Min. wird das Tier getötet und aus der Bauchhöhle werden 1,2 ccm Flüssigkeit entnommen. Die Flüssigkeit enthält Leukocyten in geringer Menge. Damit werden folgende Versuche angestellt:

Peritoneal- flüssigkeit	Aufschwemmung von 1 Oese Paratyphusbacillen zu 1 ccm physiologischer Kochsalzlösung	Die Röhrchen bleiben 1 Std. im Wasserbad bei 37°.
		Resultate
0,6 ccm	0,1 ccm (lebende Bacillen)	Jede 15 Min. werden Präparate untersucht im hängenden Tropfen sowie im gefärbten Zustand. Die Bacillen zeigen spärliche Degenerationsformen
0,6 ccm	0,1 ccm (mit Chloroform einige Minuten lang ge- tötete Bacillen)	In diesem Fall sind ziemlich viele Degenerationsformen zu sehen, sowohl im hängenden Tropfen wie im gefärbten Präparat

1) Zeitschr. f. Hyg. Bd. LII. p. 393.

Mengen von Peritonealexsudat, Meerschweinchen sogenannte Reizmittel injiziert, und zwar gebrauchte ich entweder einfache Kochsalzlösung oder Aleuronat oder Lecithin in 1-proz. Aufschwemmung.

Es zeigt sich in der Tat (Tabelle I), daß das frische Bauchhöhlenexsudat eine bessere komplettierende Wirksamkeit entfaltet, als das Serum desselben Tieres; aber der Unterschied war kein sehr großer; derselbe wird jedoch ein viel größerer, wenn wir mit abgetöteten Bacillen arbeiten. Unerwartete Resultate gaben jene Versuche, deren Anordnungen in Tabelle II näher beschrieben sind.

Tabelle II.

Meerschweinchen 80 a, 350 g, bekommt in die Bauchhöhle eingespritzt 6 ccm Aleuronataufschwemmung.

Nach 18 Std. wird das Tier entblutet. Aus der Bauchhöhle bekommt man ungefähr 2 ccm Exsudat, sehr reich an Leukocyten. Nach Defibrinierung und Zentrifugation wird die von den Leukocyten befreite Flüssigkeit zu folgenden Versuchen benutzt.

Exsudat	Immunserum	Lebende Paratyphusbacillenaufschwemmung 1 Oese zu 1 ccm Kochsalzlösung	Die Röhrchen bleiben 1 Std. im Wasserbad bei 37°.
			Resultate
0,75 ccm	0,05 ccm	0,1 ccm	Schon nach 30 Min. zeigt die Beobachtung im hängenden Tropfen sowie im gefärbten Zustande sehr deutliche Degenerationsformen. Dabei ziemlich viele Granula. Ungefähr $\frac{1}{3}$ der gesamten Bacillen zeigten Degenerationsformen
0,75 ccm	—	0,1 ccm	Auch nach 60 Min. keine deutliche Veränderung

Die von Leukocyten und sonstigen Zellelementen gänzlich befreite Flüssigkeit zeigt eine sehr deutliche komplettierende Wirkung für die Bakteriolyse, wobei eine direkte Beteiligung der Leukocyten bei unserer Versuchsanordnung natürlich ausgeschlossen war. In Kontrollen des Exsudates ohne Immunserumzusatz blieb jede Wirkung aus.

In dem in der Tabelle III näher beschriebenen Versuche, wo wir, statt lebender, getötete Bacillen angewendet haben, tritt der komplettierende Einfluß des Meerschweinchenexsudates noch mehr zutage.

Es geht aus dem eben Gesagten hervor, daß tatsächlich ein deutlicher Unterschied besteht zwischen der Wirkung des Serumkomplementes und jener des Exsudatkomplementes. Wenn schon bei lebenden Bacillen der Unterschied ein sehr deutlicher ist, so kommt er, wenn wir getötete Bacillen anwenden, noch auffälliger zum Vorschein. Sicher geht aus unserem Versuche hervor, daß es möglich ist, eine Bakterizidie in vitro gegen Paratyphus-B. zu erzeugen. Bei meinen Versuchen gelang es nie, eine Zerstörung sämtlicher Bacillen zu erzielen. Allein ich habe mich davon überzeugen können, daß eine große Zahl von Bacillen derartige Veränderungen aufweist, wie wir sie bei der echten Bakteriolyse zu sehen gewohnt sind. Es trat dies sowohl im hängenden Tropfen, als auch im gefärbten Präparat deutlich in Erscheinung; im gefärbten Präparat nicht so schön, wie im hängenden Tropfen, immerhin aber beweisend.

Nachdem ich die Bakteriolyse der Paratyphusbacillen im Reagensglasversuche dargestellt habe, möchte ich Bakterizidieversuche beschreiben,

Tabelle III.

2 ccm des, wie im vorigen Versuche, gewonnenen Exsudates werden nach Entfernung der Leukocyten mit 2 ccm Kochsalzlösung gemischt, dann zu folgendem Versuche benutzt:

Exsudat + Kochsalzlösung	Immunserum	Paratyphusbacillen mit Chloroform einige Minuten lang getötet Aufschwemmung einer Oese B. zu 1 ccm Kochsalzlösung	Die Röhrchen bleiben 1 Std. im Wasserbad bei 37°.
			Resultate
1 ccm	0,05 ccm	0,1 ccm	Nach 45 Min. zeigen fast alle Bacillen im hängenden Tropfen wie im gefärbten Zustande meistens sehr vorgeschrittene Degenerationserscheinungen
1 ccm Statt Exsudat Meerschweinchenkomplement mit Kochsalzlös. 1:1 verdünnt	—	0,1 ccm	Nach 1 Std. spärliche Degenerationsformen
1 ccm	0,05 ccm	0,1 ccm	Nach 45 Min. zeigt ungefähr die Hälfte der gesamten Bacillen Degenerationsformen. Diese sind jedoch nicht so vorgeschritten, wie im Versuch 1
1 ccm	—	0,1 ccm	Nach 1 Std. spärliche Degenerationsformen

welche ich im lebenden Tiere bei Meerschweinchen von 250—300 g streng nach der Methode Pfeiffers ausgeführt habe.

Die Bakteriolyse des Paratyphus in der Peritonealhöhle hat, obwohl sie im übrigen schneller abläuft, weitgehende Ähnlichkeit mit jener bei Typhus und entspricht im wesentlichen der für Typhus geltenden Beschreibung Pfeiffers und Kolles¹⁾.

„Man merkt, wie ein Teil der Bakterien dünner und feiner und weniger lichtbrechend wirkt, bis die Stäbchen schließlich in kleine Krümelchen zerfallen. Es macht ganz den Eindruck, als ob sie sich in der Peritonealflüssigkeit auflösen, ähnlich wie ein Stückchen Zucker im Wasser verschwindet.“

Bekanntlich dauert die Bakteriolyse bei Typhus länger als jene bei Cholera, und zwar sind beim Typhus stets mindestens 2—3 Stunden zur Auflösung sämtlicher Bakterien notwendig. Ähnliche Verhältnisse finden wir bei Paratyphus, jedoch mit einigen Unterschieden, die ich jetzt beschreiben will (s. Tabelle IV).

Die Umwandlung in Granula ist, im Einklang mit den Beobachtungen Pfeiffers und Kolles bei Typhus, bei der Zerstörung der Paratyphus-B-Bacillen bedeutend geringer ausgesprochen, als bei der Bakteriolyse der Choleravibrionen. Neben den Granula kommen bei Paratyphus noch andere Degenerationsformen in viel größerer Menge in Betracht. Da dieselben ganz analog sind mit den von Pfeiffer und Kolle bei Typhus beschriebenen, finde ich eine weitere Beschreibung derselben überflüssig.

1) Zeitschr. f. Hyg. Bd. XXI. p. 203.

Tabelle IV.

Meerschweinchen 95, 300 g, bekommt in die Bauchhöhle gleichzeitig eingespritzt
1 Oese Paratyphusbacillen + 0,05 I.-S. + physiologische Kochsalzlösung bis zu 1,5 ccm.

Entnahme	Beobachtung im hängenden Tropfen
Gleich nach der Einspritzung	Zahlreiche Bacillen
Nach 5 Min.	Noch zahlreiche Bacillen, meistens agglutiniert; spärliche Degenerationsformen; sehr spärliche Leukocyten
„ 10 „	Ziemlich viele gut erhaltene Bacillen und Degenerationsformen; sehr spärliche Leukocyten
„ 20 „	Weitere Verminderung der Bacillen, welche größtenteils degeneriert sind
„ 30 „	Spärliche Bacillen, verhältnismäßig zahlreiche Degenerationsformen. Immer sehr spärliche Leukocyten
„ 90 „	Weitere geringe Verminderung der Bacillen
„ 2 Std.	Sehr wenig Bacillen und D.-F.; noch sehr wenig Leukocyten
„ 3 „	Fast gar keine Bacillen; sehr wenig D.-F.; ziemlich zahlreiche Leukocyten
„ 5 „	Zahlreiche Leukocyten, gar keine Bacillen

Die Beobachtung der gefärbten Präparate gibt ganz analoge Resultate, wie die Untersuchung im hängenden Tropfen, doch ist die letzte Methode vorzuziehen.

1) Bei Paratyphus erscheinen die Degenerationsformen früher als bei Typhus.

2) Die Zahl der Bakterien vermindert sich viel schneller, schon innerhalb der ersten Minuten nach der Injektion.

3) Der Verlauf des ganzen Prozesses geht schneller vor sich.

Die Verminderung der Bacillen im Peritoneumexsudat ist schon nach 10–20 Minuten sehr auffällig, ja es kann das Peritonealexsudat nach dieser Zeit schon fast steril erscheinen. Da aber der etwaigen Zerstörung der Bacillen in so großem Umfange keine entsprechende Granulabildung, resp. Bildung von Degenerationsformen gegenübersteht, so war es von vornherein fraglich, ob tatsächlich die bakteriolytische Zerstörung der Bacillen den alleinigen Grund des Verschwindens der Bacillen darstellte. Um diese Zweifel aufzuklären, wurden Tiere, die, so wie oben beschrieben, behandelt worden waren, nach verschiedenen Zeiten getötet, und es wurde nach dem Verbleib der Bacillen durch eine genaue Obduktion geforscht.

Tatsächlich konnte ich in der an dem Peritoneum haftenden Exsudatschicht reichliche Bacillen im gefärbten Präparate nachweisen, ob zwar ich zuvor in dem durch Kapillaren entnommenen Exsudate wenig resp. keine Bacillen gefunden hatte. Diese Tatsache, daß an der Wand des Bauchfelles und in dessen Recessus die Bacillen sich anhäufen, ist wohl der Hauptgrund, daß die mit Kapillaren entnommene Exsudatproben eine so rasch auftretende Verminderung der Bacillenzahl aufweisen.

Leukocytenwirkung (Phagocytose) hat mit dieser Fixation der Bacillen nichts zu tun.

Diese Erscheinung tritt bei lebenden Bacillen stärker auf, als bei getöteten.

Auch für die endgültige Zerstörung der Bacillen spielt die Phagocytose keine ausschlaggebende Rolle.

Die Leukocyten gelangen in der Regel erst dann ins Peritoneum,

wenn bereits die Bakterizidie vollendet ist; nur in Fällen, wo die Bakterizidie sich hinzieht, werden die wenigen übrigbleibenden Formen von den Leukocyten phagocytiert. Bekannt ist, daß bei ungestört fortschreitender Infektion das Bauchhöhlenexsudat bald sehr arm an Leukocyten wird. Man hat Mühe, in den von Bakterien wimmelnden Exsudatproben hier und da vereinzelte Leukocyten nachzuweisen. Es war daher interessant, Versuche darüber anzustellen, ob auch bei derartig durch schon bestehende Infektion erzeugten leukopenischen Zuständen des Peritoneums, unter dem Einflusse des nachgespritzten Immunserums noch echte Heilungen möglich sind, und durch welchen Mechanismus sie zustande kommen. Wir konnten uns überzeugen, daß auch unter solchen Umständen typische Bakteriolyse eintritt. Spritzt man einem Tier die dreifache tödliche Bacillendosis intraperitoneal ein, so vermehren sich die Paratyphusbacillen innerhalb kurzer Zeit zusehends; spritzt man nach 1 Stunde 30 Min. ein Multiplum von Immunserum gleichfalls intraperitoneal ein, so tritt eine vollständige Paratyphusbakteriolyse ohne irgendwelche Mitwirkung von Leukocyten in die Erscheinung.

Tabelle V.

Meerschweinchen 83, 320 g, bekommt in die Bauchhöhle eingespritzt $\frac{1}{2}$ Oese Paratyphusbacillen in 1 ccm Kochsalzlösung aufgeschwemmt.

90 Min. nach der Einspritzung sind sehr viele Bacillen zu sehen. Sehr spärliche Leukocyten. Zu dieser Zeit wird dem Tier eingespritzt 0,25 ccm I.-S. mit Kochsalzlösung zu 1 ccm aufgefüllt.

Entnahme	Beobachtung im hängenden Tropfen
Nach 10 Min.	Ziemlich viele Bacillen; mäßige Zahl von degenerierten Formen; spärliche Leukocyten
„ 20 „	Beträchtliche Verminderung der Bacillen; die Degenerationsformen haben im Verhältnis zugenommen; spärliche Leukocyten
„ 50 „	Spärliche Bacillen, Degenerationsformen und Leukocyten
„ 90 „	Fast gar keine Bacillen und Degenerationsformen. Leukocyten immer spärlich
„ 4 Std.	Keine Bacillen, keine Degenerationsformen, ziemlich viele Leukocyten

In gefärbten Präparaten ist nur eine sehr geringe Phagocytose zu beobachten.

Die Versuche fallen aber anders aus, wenn wir eine geringe Dosis Immunserum anwenden, wie wir aus der Tabelle VI ersehen.

Tabelle VI.

Meerschweinchen 70, 270 g, bekommt in die Bauchhöhle gleichzeitig eingespritzt 1 Oese Paratyphusbacillen + 0,01 I.-S. + physiologische Kochsalzlösung bis zu 1,5 ccm

Entnahme	Beobachtung im hängenden Tropfen
Gleich nach der Einspritzung	Zahlreiche Bacillen; spärliche Leukocyten
Nach 10 Min.	Ziemlich viele Bacillen, mäßige Zahl von Degenerationsformen; spärliche Leukocyten
„ 20 „	Beträchtliche Verminderung der Bacillen; Zahl der Degenerationsformen und der Leukocyten unverändert
„ 30 „	Spärliche Bacillen, Degenerationsformen und Leukocyten
„ 60 „	Sehr spärliche Bacillen, Degenerationsformen im Verhältnis zahlreich; ziemlich viele Leukocyten
„ 2 Std.	Keine Bacillen; sehr spärliche Degenerationsformen; ziemlich viele Leukocyten

Die Degenerationsformen der Bacillen treten ebenso deutlich wie im vorigen Versuche hervor. Doch schon nach 60 Min. ist eine deutliche Phagocytose zu sehen.

Die Prüfung im hängenden Tropfen und im gefärbten Präparate zeigt in diesem Falle unzweifelhaft, daß in der ersten Zeit der Zerstörungsprozeß nur außerhalb der Leukocyten vor sich geht; erst später beteiligen sich die Leukocyten, die inzwischen ins Peritoneum eingetreten sind, indem sie die noch nicht aufgelösten Bacillen phagocytieren. Wie wir also sehen, geht hier die Zerstörung der Mikroorganismen in doppelter Weise vor sich.

In der ersten Zeit findet sie extracellulär bei Abwesenheit von Leukocyten statt, in der Zeit darauf in den Leukocytenleibern. Wie verhalten sich nun die Dinge, wenn wir durch eine vorherige Reizbehandlung in dem Meerschweinchenperitoneum ein steriles Exsudat erzeugt haben?

Tabelle VII.

Meerschweinchen 72, 270 g, bekommt in die Bauchhöhle eingespritzt 2 ccm einer 1-proz. Lecithinemulsion (in physiologischer Kochsalzlösung).

Nach 18 Std. sind im Peritoneum sehr viele Leukocyten vorhanden. Zu dieser Zeit werden noch dem Tier eingespritzt 1 Oese Paratyphusbacillen (in 1,5 ccm Kochsalzlösung aufgeschwemmt) + 0,01 I.-S. (beide waren vorher 20 Min. in Kontakt).

Entnahme	Beobachtung im hängenden Tropfen
Gleich nach der Einspritzung	Sehr viele Bacillen und Leukocyten
Nach 6 Min.	Geringe Verminderung der Bacillen und der Leukocyten
„ 10 „	Spärliche Bacillen und Degenerationsformen; ziemlich viele Leukocyten
„ 30 „	Gar keine Bacillen; sehr viele Leukocyten

Einige Degenerationsformen treten auch bei diesem Versuche in der freien Flüssigkeit hervor. Die Beobachtung der gefärbten Präparate zeigt hier eine deutliche Phagocytose schon nach 10 Min. Nach 30 Min. ist eine vollständige Phagocytose zu beobachten.

In diesem Falle wird nur ein kleiner Teil der Bacillen außerhalb der Leukocyten zerstört, die Zerstörung findet hier hauptsächlich innerhalb der Leukocyten statt.

Ich habe hier drei Versuchstypen beschrieben. Im ersten Falle sahen wir die Bakteriolyse im freien Exsudat bei Abwesenheit von Leukocyten eintreten; im zweiten Falle konnten wir eine Zerstörung der Bacillen sowohl im freien Exsudate als auch in den später hinzugekommenen Leukocyten beobachten.

Im dritten Falle sahen wir die Vorgänge sich ausschließlich in den Leukocyten abspielen. Es ist nun die Frage: Handelt es sich hier um drei verschiedene Prozesse, oder ist hier, trotz des scheinbar verschiedenen Verlaufes, in allen drei Fällen ein gleicher Vorgang zu beobachten, der sich nur verschieden manifestiert?

Pfeiffer und Wassermann vertreten die Ansicht, daß es von der Art und der Widerstandsfähigkeit der Bakterien abhängt, ob vorwiegend Lysis oder Phagocytose eintrete. Bei leicht auflösbaren Arten, wie den Choleravibrionen, tritt die Auflösung im freien Serum in den Vordergrund, andere dagegen, wie die Streptokokken, setzen der Lösung starken Widerstand entgegen, so daß die lytische Destruktion sich in die Länge zieht und die Leukocyten daher Zeit haben, sich zu sammeln und die von den gelösten bakteriziden Immunstoffen angedauten und

dadurch positiv chemotaktisch wirkenden Bakterien aufzunehmen. Ähnlich liegen die Dinge meiner Meinung nach beim Paratyphus. Auch hier tritt, wenn das Immunserum in genügend reichlichen Dosen angewendet wird und der Zerstörungsprozeß der Bacillen deshalb sehr schnell stattfindet, die Zerstörung der Bacillen extracellulär ein, bevor noch die Leukocyten überhaupt Gelegenheit hatten, einzugreifen. Wenn dagegen die angewendete Serummengde eine geringere ist, oder wenn wir es mit resistenteren Bacillen, z. B. serumfesten Stämmen, zu tun haben (frisch aus dem Tier gezüchteten Bacillen), so dauert der Zerstörungsprozeß so lange, daß die inzwischen im Peritoneum erschienenen Leukocyten Gelegenheit haben, die in der Bakterizidie begriffenen Bacillen zu phagocytieren, so daß dann in den Leukocytenleibern die bereits begonnene Bakterizide vollendet wird. Es wäre dabei immer noch möglich, daß die Zellenwirkung der Leukocyten bei diesem Prozeß nicht indifferent sei, und daß Endofermente hierbei irgendeine Rolle spielen. Doch ist es mir nicht gelungen, durch verschiedene Extraktionsmethoden wirksame Stoffe aus den Leukocyten zu isolieren.

Bei den bis jetzt beschriebenen Versuchen ist immer störend die Resistenz gewisser Bacillenindividuen, von denen, während die anderen Bacillen zerfallen, eine Vermehrung ausgeht. Ich habe mich daher entschlossen, diese ganzen Experimente auch noch mit abgetöteten Bacillenleibern zu wiederholen. Bei diesen Versuchen sind die Verhältnisse ähnlich, wie bei den früher mit lebenden Bacillen beschriebenen; jedoch sind sie hier noch auffälliger und beweisender, weil wir hier eben die gleichzeitig vor sich gehende Bacillenvermehrung ausgeschaltet haben. Auch die toten Bacillen zeigen bei der Zerstörung gewisse graduelle Verschiedenheiten in der Widerstandsfähigkeit. Während der größte Teil der Bacillen innerhalb 30 Minuten zugrunde geht, bleibt immerhin eine geringe Zahl von resistenteren Individuen übrig, welche so gut wie gar keine Degenerationserscheinungen, weder in bezug auf ihre morphologische Eigenschaften, noch auf ihre Färbbarkeit zeigen.

Besonders bemerkenswert ist auch, daß bei diesen Versuchen gar keine Beteiligung der Leukocyten an dem Prozesse zu beobachten ist. Wir finden anfangs nur ganz vereinzelte Leukocyten, welche neben den bakterioliysierten Bacillen zu sehen sind, erst nach beiläufig 3 Stunden tritt eine größere Leukocytose ein, welche aber sich immerhin in bescheidenen Grenzen hält.

Wie bei den lebenden Bacillen, so findet jedoch auch bei toten Bacillen eine starke Phagocytose statt, wenn wir in der Leibeshöhle des Meerschweinchens vor der Bakterieninjektion eine Leukocytose erzeugt haben.

Wenn ich zum Schlusse meine Ergebnisse zusammenfasse, so stehen sie in vieler Beziehung im Widerspruch mit Neufelds Angaben.

Ich habe mich im Einklang mit früheren Autoren davon überzeugt, daß in der Leibeshöhle des Meerschweinchens eine deutliche extracelluläre Bakteriolyse der Paratyphusbacillen stattfindet; in vitro dagegen können wir, wenn wir uns der Versuchsanordnung von Sterne und Korte bedienen, keine Bakteriolyse beobachten. Doch liegen auch in Reagensglasversuch die Dinge nicht so einfach, wie Neufeld annimmt.

Ich halte es für notwendig, an dieser Stelle mit einigen Worten nochmals die Versuche Laubenheimers zu streifen. Die Resultate Laubenheimers sind deshalb beachtenswert, weil sie beweisen, daß, entgegen den Angaben Neufelds, eine Bakteriolyse gegen Paratyphus

im Reagensglase stattfinden kann. Diese Tatsache wird auch durch meine Versuche bestätigt.

Besonders beweisend halte ich jene Versuche, bei welchen ich als Komplement Peritonealflüssigkeit verwendet habe. Außerdem geht aus meinen Versuchen hervor, daß es sich hier um Komplexe, aus Ambozeptor und Komplement zusammengesetzte Bakteriolytine handelt.

Immerhin ist der bakteriolytische Vorgang im Tierkörper stets sehr viel stärker ausgebildet, als auch unter den günstigsten Bedingungen des Reagensglasversuches.

Wenn Bail sagt, daß die Vorgänge im Peritoneum sich ganz analog abspielen, wie in vitro, und wenn er sogar die Peritonealhöhle als eine Art von Reagensglas betrachten will, so sprechen doch unsere Versuche für die Richtigkeit der Behauptung Pfeiffers, daß aus Reagensglasversuchen allein keine richtigen Schlüsse auf die Vorgänge im Tierkörper zu ziehen sind. Es könnte angenommen werden, daß hier wesentlich die Quantität des Komplementes in Betracht komme; allein es scheint doch, daß mehr eine qualitative Verschiedenheit des Komplementes der Leibeshöhle von jener des Serums die Differenz in den Resultaten zur Folge hat. Ziehen wir noch in Betracht die Veränderungen, welche das wirksame Peritonealexsudat durch Defibrinierung, Zentrifugation u. dgl. erleidet, ehe es zum Versuche verwendet wird, so dürfen wir wohl den Schluß ziehen, daß eine Komplementwirkung im lebenden Organismus eine viel beträchtlichere sein dürfte, als wie wir sie in unseren Reagensglasversuchen zu beobachten imstande waren.

Bereits Bordet und Gay¹⁾ haben neuerdings auf tiefgehende Unterschiede zwischen Serum- und Peritonealexsudat hingewiesen. Beim Studium der antagonistischen Substanzen von Pfeiffer und Friedberger²⁾ haben sie gefunden, daß, im Gegensatz zum Serum, das inaktivierte Peritonealexsudat keine antagonistischen Wirkungen aufweist. Bordet und Gay behaupten, daß das Vorhandensein von antagonistischen Substanzen im Serum wohl die Ursache dafür sei, daß der Prozeß der Bakteriolyse in vitro bei Choleravibrionen langsamer und unvollständiger vor sich geht, als im lebenden Organismus. Meiner Meinung nach könnte die Bordet-Gaysche Erklärung auch für den verschiedenen Verlauf der Paratyphusbakteriolyse in vitro und in vivo herangezogen werden. Jedenfalls ist mit der Annahme zu rechnen, daß nicht nur Serumkomplement und Exsudatkomplement verschieden wirken, sondern daß auch noch eine weitergehende Verschiedenheit in dem chemischen Aufbau beider Körperflüssigkeiten existieren dürfte. Wenn Neufeld eine bakteriolytische Wirkung des Paratyphusserums leugnet, so ist er in den Fehler verfallen, die Bedeutung der Reagensglasversuche zu überschätzen, und hat die Versuche Laubenheimers als auch aller derjenigen Autoren, welche in vivo Bakteriolyse deutlich beobachtet und beschrieben haben, einfach unberücksichtigt gelassen. Damit fällt einer der Hauptbeweise Neufelds für die Annahme, daß Bakteriolytine und Bakteriotropine verschiedene Substanzen sind, in sich zusammen.

Ich möchte es nicht unterlassen, an dieser Stelle Herrn Geheimrat Prof. Dr. R. Pfeiffer für das gütige Interesse, mit welchem er meine Arbeit gefördert hat, meinen herzlichsten Dank auszusprechen.

1) Annales de l'Inst. Pasteur. 1908. No. 8.

2) Deutsche med. Wochenschr. 1905. p. 6.

Nachdruck verboten.

Ueber den Wert des Kindborgschen Säurefuchsinagars für die Typhusdiagnose.

[Aus dem Hygienischen Institut der Universität zu Königsberg i. Pr. (Direktor Geh. Med.-Rat Prof. Dr. R. Pfeiffer).]

Von Dr. Doepner.

Zur Untersuchung von Stuhl- und Urinproben auf Typhusbacillen werden mit Vorteil Nährböden verwandt, die eine Beimengung verschiedener Zuckerarten und außerdem Farbstoffe enthalten. Indem die verschiedenen Bakterien der Typhus-Coli-Gruppe auf die Zuckerarten verschiedenartig einwirken, entstehen Spaltungsprodukte, die ihrerseits Veränderungen in der Farbe der beigemengten Farbstoffe bewirken und so die Unterscheidung von Typhus- und Coli-Kolonieen außerordentlich erleichtern. Die hauptsächlichsten Vertreter dieser, eine Farbenreaktion bezweckenden Nährböden sind der Nährboden von v. Drigalski und Conradi und der Endosche Nährboden.

Der erstgenannte Nährboden hat den Nachteil, daß seine Herstellung recht umständlich ist, und daß man bei künstlicher Beleuchtung die nicht sehr hervorstechenden Farbenunterschiede von Typhus- und Coli-Kolonieen nicht erkennen kann, sowie daß überhaupt die Erkennung ganz vereinzelter Typhuskolonieen Schwierigkeiten macht. Dazu kommt noch, daß der Zusatz von Kristallviolett außer saprophytischen Keimen auch die Typhusbacillen nicht unerheblich im Wachstum hemmt, so daß, wenn nur wenige Typhuskeime sich in der Stuhlprobe befanden, diese auf dem Nährboden leicht von Coli-Kolonieen überwuchert werden können.

Aus allen diesen Gründen haben eine große Anzahl von Untersuchern den Nährboden von v. Drigalski und Conradi verlassen und sich dem Endoschen Nährboden zugewandt, dessen Zubereitung einfacher ist und auf dem man auch ganz vereinzelte Typhuskolonieen leicht herausfinden kann (1). Auch in dem Untersuchungsamt für ansteckende Krankheiten des Hygienischen Institutes zu Königsberg wird, nachdem einige Jahre lang beide Nährböden gleichzeitig zur Typhusdiagnose benutzt worden waren, jetzt ausschließlich aus den erwähnten Gründen der Endosche Nährboden angewandt [Scheller (2)].

Immerhin hat auch der Endosche Nährboden seine Mängel; es ist dies besonders der Umstand, daß auf ihm sehr viele saprophytische Bakterien gut gedeihen, und ebenso, daß durch Diffusion der durch Coli-Bacillen und andere Säurebildner hervorgerufenen roten Färbung des Nährbodens etwaige spärliche Typhuskolonieen ebenfalls rot erscheinen.

Neuerdings ist von E. und A. Kindborg (3) ein Nährboden angegeben worden, der einerseits gewisse Nachteile, die den erwähnten beiden Nährböden anhaften, nicht aufweisen, andererseits eine gleichzeitige Anwendung des Malachitgrünanreicherungsverfahrens ermöglichen soll. Das Prinzip dieses Nährbodens ist folgendes: Agar wird durch Zusatz von 5 Proz. einer konzentrierten wässerigen Säurefuchsinlösung (Grübler) rot gefärbt. Dieses, eine Sulfosäure des Rosanilins, wird durch eine Reihe von Bakterien, darunter auch Coli- und Typhusbacillen, entfärbt. Zur Unterscheidung dieser Bakterienarten dient ein Zusatz von 5 Proz. Milchzucker zum Agar. Coli-Bacillen zersetzen den Milchzucker unter Säurebildung, wodurch die rote Farbe des Nährbodens wiederhergestellt wird. Es erscheinen somit auf dem Kindborgschen

Nährboden Typhuskolonien und ebenso diejenigen verwandter Arten farblos auf rotem Grunde, Coli-Kolonien und die der meisten saprophytischen Mikroorganismen rot.

Die Verwendung des Säurefuchsin zur Erkennung von Typhuskolonien ist nicht neu; Mankowski (4) gibt ein Gemisch von einer Säurefuchsinlösung in 1-proz. Kalilauge und einer Indigokarminlösung an, das auf Oberflächenkulturen von Typhus- und Coli-Bacillen geträufelt, eine verschiedenartige Färbung der Kolonien dieser Bakterien bewirkt.

Romond (5) empfiehlt einen Nährboden mit Säurefuchsin und 4 Proz. Laktose, der durch Kochen mit Sodalösung entfärbt werden soll. Coli-Bacillen sollen auf diesem Nährboden unter Rotfärbung der Umgebung wachsen, während Typhusbacillen keine Farbenänderung hervorrufen. Es ist somit die beim Romondschen Nährboden beabsichtigte Farbenreaktion im Grunde dieselbe wie beim Kindborgschen Säurefuchsin-nährboden, nur daß der Grundton des Romondschen Nährbodens weiß, der des Kindborgschen rot ist.

Als Vorteile ihres Nährbodens geben E. und A. Kindborg folgende an:

- 1) Denkbar einfachste und bequemste Herstellung;
- 2) größte, bei jeder Beleuchtung hervortretende Deutlichkeit der Farbenreaktion;
- 3) Beschränkung der typhus- (bezw. dysenterie-)ähnlichen Kolonien auf einen kleinen Kreis von Bakterienarten;
- 4) die Möglichkeit, die Färbungsreaktion unmittelbar mit dem Löfflerschen Malachitgrün kombinieren zu können und dadurch die zeitraubende Vorkultur entbehrlich zu machen;
- 5) die Ueberflüssigkeit einer mikroskopischen Durchsicht der Platte, da sich auch kleine Typhuskolonien durch den hellen Entfärbungsring in vergrößertem Maßstabe geltend machen.“

Was die Zubereitung des Nährbodens anbetrifft, so ist diese in der Tat sehr einfach. Es bedarf nur des Zusatzes bestimmter Mengen von der vorrätig zu haltenden Säurefuchsinlösung, von Milchzucker und von Lauge zu dem fertiggestellten lackmusneutralen Agar; dann kann man nach kurzem Aufkochen zur Lösung des Milchzuckers den Nährboden entweder sofort verwenden oder ihn in Kölbchen oder Röhrchen abgefüllt zu späterer Benutzung aufheben. Ein allzulanges Kochen ist allerdings zu vermeiden, da hierdurch die rote Färbung leidet, was jedoch den Eintritt der Reaktion nicht wesentlich beeinträchtigt. Hervorheben möchte ich, daß der Nährboden außerordentlich gleichmäßig ausfällt und man seine Herstellung im Gegensatz z. B. zu dem Nährboden von v. Drigalski und Conradi jedem Laboratoriumsdiener, der überhaupt Nähragar zu bereiten versteht, überlassen kann.

Nur gegen eine Vorschrift von E. und A. Kindborg möchte ich mich wenden; nach dieser sollen die Platten „nach dem Erstarren auf mindestens 24 Stunden“ in den Brutschrank kommen, um dort das Kondenswasser zu verlieren. Dies Verfahren scheint mir die Benutzung des Nährbodens unnötig zu erschweren, und für ein Untersuchungsamt, bei dem man nicht vorher wissen kann, wieviel Platten am nächsten Tage gebraucht werden, kaum durchführbar zu sein. Ich trocknete daher die Platten in der Weise, daß ich sie offen und umgekehrt für etwa zwei Stunden in den Brutschrank brachte; diese Zeit genügte in der Regel völlig zum Trocknen der Platten; ein Verweilen dieser über 4 Stunden im Brutschrank erschien mir nicht ratsam, da dann häufig an einzelnen

Stellen der Nährboden zu einer dünnen harten Schicht eintrocknete, auf der ein Wachstum von Bakterien nicht mehr möglich war.

Was den Eintritt der Farbenreaktion anbetrifft, kann ich im allgemeinen die Angaben E. und A. Kindborgs bestätigen. Die Bakterien der Typhus-Coli-Gruppe mit Ausnahme von Coli entfärben den Nährboden, wie ich mich durch Versuche mit verschiedenen Stämmen der einzelnen Bakterienarten überzeugt habe. Coli dagegen läßt den Nährboden rot, und zwar ist die um Coli-Kolonieen sichtbare rote Färbung eine deutlich andere als die ursprüngliche Farbe des Nährbodens.

Die Zeit, in der die einzelnen Bakterien der Typhusgruppe den Nährboden entfärben, ist verschieden; in einer Versuchsreihe mit Aussaat gleicher Mengen der einzelnen Bakterien war durch *B. enteritidis* (Gärtner) und *B. paratyphi* B bereits in 14 Stunden völlige Entfärbung eingetreten, während Typhus- und Dysenteriekolonieen noch völlig entfärbt erschienen, *B. paratyphi* a sogar zu dieser Zeit um die Kolonieen einen deutlichen roten Hof aufwies, dessen Farbennuance der durch Coli-Bacillen hervorgerufenen Färbung des Nährbodens entsprach. Nach 17 Stunden zeigten sich in diesem Versuch die Typhuskolonieen völlig entfärbt, die von *B. dysenteriae* und *B. paratyphi* a jedoch erst nach 21 Stunden. Im Laufe meiner Untersuchungen konnte ich übrigens beobachten, daß auch verschiedene Stämme von Typhusbacillen verschieden schnell den Nährboden entfärbten; einen Typhusstamm, bei dem die Entfärbung ausblieb, habe ich nicht gefunden.

Entfärbung des Säurefuchsinährbodens wurde außer durch die Bakterien der Typhusreihe auch durch *Proteus*, *Pyocyaneus*, einen Stamm von *Staphylococcus albus* und eine Anzahl anderer Bakterien bewirkt. Immerhin ist die Zahl der Bakterien, die den Säurefuchsinährboden entfärben, erheblich geringer als diejenige der auf dem Endoschen Nährboden farblos wachsenden Keime. Es erleichtert dies in der Praxis außerordentlich die Untersuchung auf Typhus, da eine große Anzahl von Kolonieen, die auf dem Endoschen Nährboden vielleicht verdächtig erscheinen könnten, hier von vornherein ausscheiden.

Ein weiterer Vorzug des Säurefuchsinagars vor dem Endoschen Nährboden besteht darin, daß man ihn sowohl vor dem Beimpfen als auch nachdem sich verschieden auf ihn einwirkende Kolonieen entwickelt haben, unbedeckt am Tageslicht stehen lassen kann, ohne daß eine wesentliche Aenderung der Farben eintritt.

Naturgemäß ist auch bei dem Säurefuchsinährboden wie bei den anderen die Farbenreaktion nicht auf die Kolonieen selbst beschränkt, sondern schreitet in die Umgebung derselben fort; es gilt dies sowohl für die Entfärbung, als auch für die Rotfärbung durch Coli-Bacillen, die, wie gesagt, eine andere Farbennuance, als sie der Nährboden selbst hat, darbietet. Es ist hierbei hervorzuheben, daß die Rotfärbung durch Coli-Kolonieen die Entfärbung durch andere Keime überdeckt, so daß eine Platte, die ziemlich dicht mit Coli-Kolonieen, zwischen denen sich vereinzelt Typhuskolonieen befinden, bewachsen ist, völlig rot erscheint. Trotzdem heben sich hierbei die Typhuskolonieen durch ein leicht bläuliches Aussehen und ihre flache durchsichtige Beschaffenheit sehr deutlich von den Coli-Kolonieen ab, und zwar sowohl bei Tagesbeleuchtung, als bei Lampenlicht.

Bei Aussaat von Gemischen von Typhus- und Coli-Bacillen in verschiedenen Verhältnissen auf Endo-Platten und dem Säurefuchsinährboden war die Grenze der Nachweisbarkeit von Typhuskolonieen etwa

die gleiche, da ja durch den Säurefuchsinährboden eine relative Anreicherung der Typhuskeime nicht bewirkt wird.

Es ist daher bereits von E. und A. Kindborg als ein Vorzug des Säurefuchsinährbodens erwähnt, daß man durch Hinzufügung von Malachitgrün eine Anreicherung der Typhuskeime erzielen und dadurch die zeitraubende Anreicherung auf besonderen Malachitnährböden umgehen könne. E. und A. Kindborg setzten dem Nährboden 4 Proz. einer Lösung von 1:120 Malachitgrün Ia zu, ohne jedoch gerade dieses Präparat als das für ihren Nährboden geeignetste zu bezeichnen.

Ich stellte Versuche an mit verschiedenen 2 alten Proben von Malachitgrün 120 (Höchst) und mit einer Probe von „Malachitgrün chemisch rein Chlorzinkdoppelsalz“. Bei diesen Versuchen fand ich, daß bezüglich ihrer Empfindlichkeit gegen Malachitgrün von den von mir untersuchten Stämmen Staphylokokken und Dysenteriebacillen in erster Linie stehen; weniger empfindlich ist *Proteus vulgaris*; es folgen dann die Coli-Bacillen; widerstandsfähiger als diese sind im allgemeinen die Typhusbacillen, in noch höherem Grade *B. enteritidis* (Gärtner); sehr hohe Beimengungen von Malachitgrün zum Nährboden vertragen die Paratyphusbacillen und der *Pyocyaneus*.

Die ältere Probe des Malachitgrün 120 verhinderte erst in einer Konzentration von 1:5500 das Wachsen von Staphylokokken und Dysenteriebacillen; ein Gehalt des Nährbodens von 1 Teil Malachitgrün auf 2000 war notwendig, um das Wachsen von *Proteus vulgaris* zu verhindern.

Bei der frischeren Probe von Malachitgrün 120 genügte eine Konzentration von 1:8300, um Staphylokokken und Dysenteriebacillen, und eine solche von 5500, um *Proteus* nicht mehr aufkommen zu lassen. Enthielt der Nährboden auf 2000 Teile 1 Teil Malachitgrün, so wuchsen Coli-Bacillen nicht mehr, während das Wachstum von Typhusbacillen etwas gehemmt war.

Das Chlorzinkdoppelsalz des Malachitgrüns verhinderte bereits in einer Verdünnung von 1:100 000 das Wachstum von Staphylokokken, Dysenteriebacillen und *Proteus vulgaris*, bei einer Konzentration von 1:16 600 waren Coli-Bacillen ziemlich stark im Wachstum gehemmt, bei einer solchen von 1:13 300 wuchsen auch Typhusbacillen nicht mehr.

In meinen weiteren Untersuchungen benutzte ich fast stets die frischere Probe von Malachitgrün 120, und zwar setzte ich zu 100 ccm des Nährbodens 5 ccm einer 1-proz. Lösung. Die Malachitgrünlösung wurde in geringen Mengen, die für wenige Tage ausreichten, mit kaltem sterilisierten Wasser hergestellt, da ich mich von der Richtigkeit der Angabe Doeberts (6), daß die Wirksamkeit von Malachitgrünlösungen sich mit dem Alter ändert, überzeugen konnte.

Der Zusatz des Malachitgrüns zum Nährboden erfolgte stets erst unmittelbar vor dem Gießen desselben in Petri-Schalen, um eine Abschwächung der hemmenden Wirkung des Malachitgrüns durch das Kochen zu verhüten; so wuchsen in einem Versuch auf einem mit Malachitgrün chemisch rein in einer Konzentration von 1:12500 vor der Sterilisation im Dampf versetzten Nährboden Typhusbacillen gut, während sie sonst schon bei einem geringeren Malachitgrünzusatz sich nicht mehr zu entwickeln vermochten.

In ähnlicher Weise sah ich auch eine Abnahme der Malachitgrünwirkung, wenn die fertig gegossenen Platten dem Sonnenlichte ausgesetzt wurden, während diffuses Tageslicht keine deutliche Veränderung im Vergleich zu einer gleich lange Zeit im Dunkeln aufbewahrten Platte bewirkte.

Von großem Einfluß auf die Wirkung des Malachitgrüns ist die Reaktion des Nährbodens, und zwar hat es nach meinen Versuchen den Anschein, als ob es ein ganz bestimmtes Optimum der alkalischen Reaktion gibt:

Zu lackmusneutralem Agar, das ja den Ausgangspunkt bei der Herstellung des Säurefuchsin-nährbodens bildet, setzte ich außer Säurefuchsin, Milchzucker und Malachitgrün wechselnde Mengen von Normalnatronlauge resp. Normalschwefelsäure, goß den Nährboden in Platten und beimpfte die Oberfläche mit Strichen von verschiedenen Bakterienarten:

Zusatz zu 100 ccm Agar	Wachstum nach 17 Stunden von:						
	B. coli	B. typhi	B. paratyphi	B. enteritidis	B. dysenteriae	Proteus vulgaris	Staphylokokken
0,25 ccm Normal-SO ₂	++	++	++	++	—	—	—
0	+(+)	++	++	++	—	—	—
0,25 ccm Norm.-NaOH	+	+(+)	++	++	—	—	—
0,5 „ „ „	+	+(+)	++	+(+)	—	—	—
0,75 „ „ „	(+)	+(+)	++	+(+)	—	—	—
1,00 „ „ „	—	+(+)	++	+(+)	—	—	—
1,25 „ „ „	+	++	++	++	—	—	—

Entsprechend dem Ausfall dieser Versuche setzte ich zu 100 ccm des Säurefuchsin-Malachitgrünagars 1 ccm Normalnatronlauge zu. In einer Versuchsreihe konnte ich übrigens keinen deutlichen Einfluß auf die Wirkung des Malachitgrüns von der Art der zum Alkalisieren verwandten Substanz, Kali- resp. Natronlauge oder Sodalösung, bemerken, indessen habe ich keine hinreichenden Erfahrungen hierüber. Löffler (7) fand bekanntlich, daß bei Verwendung von Kalilauge die Typhuskolonien größer und vielleicht deutlicher gefurcht sind als beim Alkalisieren mit Sodalösung.

Auf den mit Malachitgrün versetzten Säurefuchsinagar und gleichzeitig auf Endo-Platten strich ich gleiche Mengen von Gemischen von Typhus- und Coli-Bacillen aus. Ich konnte hierbei bei mehrfachen Versuchsreihen Typhuskolonien noch auf dem Malachitgrünnährboden nachweisen, wenn in dem Bacillengemisch nur etwa ein Drittel der Menge von Typhusbacillen vorhanden war, die sich auf den gleichzeitig angelegten Endo-Platten noch als Kolonien feststellen ließen. Es liegt dies daran, daß bei einem geringen Prozentsatz von Typhusbacillen auf den ersten Endo-Platten jeder Versuchsreihe die Typhuskolonien von Coli-Kolonien überwuchert wurden, während auf den folgenden Platten die Anzahl der Keime schon so gering war, daß sich keine Typhusbacillen mehr darunter befanden. Auf dem Säurefuchsin-Malachitgrünnährboden dagegen zeigten sich bei dem gleichen Prozentgehalt an Typhusbacillen in der zur Aussaat verwandten Flüssigkeit, auf den ersten Platten infolge des Zurücktretens der Coli-Kolonien die vereinzelt Typhuskeime zu isolierten, den Nährboden entfärbenden Kolonien ausgewachsen.

Ich hatte, wie gesagt, zu meinen Versuchen Malachitgrün 120 gebraucht, das schwächer wirksam ist als das chemisch reine Malachitgrün: ich tat dies aus dem Grunde, weil bei meinen Versuchen die Konzentrationen, bei denen Coli- und Typhusbacillen nicht mehr wuchsen, bei diesem Malachitgrün weiter auseinanderlagen, als bei dem chemisch reinen. Da nun Nowack (8) den Unterschied der Wirkung der beiden Malachitgrünarten darauf zurückführt, daß das Malachitgrün 120 Dextrin beigemischt enthält, und annimmt, daß das Dextrin die Wirkung des Malachitgrüns aufhebe, resp. vermindere, prüfte ich dies nach, indem ich

in mehreren Versuchsreihen, bei denen ich dem Säurefuchsinährboden chemisch reines Malachitgrün in verschiedenen Mengen zusetzte 3, 2, 1 und 0 Proz. Dextrin hinzufügte und auf die Oberfläche der Platten verschiedene Bakterienarten in Strichen aussäte. Bei allen Versuchen zeigte sich mir das Fehlen einer Einwirkung des Dextrins auf die hemmenden Eigenschaften des Malachitgrüns.

In einem anderen Versuche fügte ich zu dem mit Malachitgrün 120 versetzten Säurefuchsinährboden 4 Proz. Dextrin hinzu und besäte diese Platten, Malachitgrün-Säurefuchsinplatten ohne Dextrinzusatz und Agarplatten mit Typhus- und Coli-Aufschwemmungen in gleichen Mengen und zählte die Kolonien, die sich entwickelten.

	A. Agar	Zahl der Kolonien auf:		Prozentsatz der gewachsenen Kolonien im Vergleich zu A	
		B. Malachitgrün-Säurefuchsinagar	C. Malachitgrün-Säurefuchsinagar + 4 Proz. Dextrin	B	C
B. coli	10 400	4 940	5 135	47	49
B. typhi	4 615	3 705	4 030	80	87

Es zeigten sich hier also, trotzdem zu dem Nährboden 4 Proz. Dextrin zugesetzt wurden, nur geringe Unterschiede, die einerseits im Bereich der Fehlerquellen liegen, andererseits dadurch erklärt werden könnten, daß durch das Hinzufügen des Dextrins in 20-proz. wässriger Lösung (das sind 2 ccm auf 10 ccm Agar) die Konzentration des Malachitgrüns verringert wurde. Es sprechen demnach meine Resultate gegen die Richtigkeit der Anschauung Nowacks über die Wirkung des Dextrins auf das Malachitgrün.

Um einen sicheren Anhalt darüber zu erhalten, was für Resultate man bei der Anwendung des Malachitgrün-Säurefuchsinährbodens bei der Untersuchung typhusbacillenhaltiger Objekte zu erwarten habe, zählte ich in einer größeren Anzahl von Versuchsreihen die Zahl der Kolonien von Typhus- und Coli-Bacillen, die auf dem Malachitgrün-Säurefuchsinährboden im Vergleich zur gewöhnlichen lackmusneutralen Agarplatte zur Entwicklung kamen. Ich fand bei diesen Versuchen bestätigt, was ich nach dem Ausfall anderer Versuche erwartet hatte und was auch von anderen Autoren (Doebert l. c. u. a.) schon gefunden wurde, daß verschiedene Stämme ein und derselben Bakterienart außerordentlich große Unterschiede in der Empfindlichkeit gegen Malachitgrün aufweisen. Es wuchsen bei Aussaat der Kulturaufschwemmungen auf die Oberfläche von Agarplatten und von mit Malachitgrün versetzten Säurefuchsinplatten auf letzteren folgende Prozentsätze von Kolonien im Vergleich mit den auf Agarplatten gezählten:

Typhus Gießen	80	Proz. im Mittel von 5 Bestimmungen;
„ Wassermann	66	„
„ Frankfurt	7	„ „ „ 3 „
„ 7	86	„
„ Bail	31	„
„ Moersch	77	„
„ 02	35	„

Bei Aussaat eines Eiters, in dem sich Typhusbacillen in Reinkultur befanden, wuchsen auf dem Malachitgrün-Säurefuchsinährboden 87 Proz. der Keime, die auf Agar zur Entwicklung gelangt waren.

Von einem seit Jahren auf künstlichen Nährböden fortgezüchteten Coli-Stamm unserer Sammlungen wuchsen im Mittel von 7 Bestimmungen 32 Proz. der eingesäten Keime auf dem Malachitgrün-Säurefuchsinagar, von einem anderen, erst vor einigen Wochen reingezüchteten Coli-

Stamm 0,9 Proz. Bei Aussaat von zur Untersuchung eingesandten Stuhlproben wuchsen auf dem Malachitgrün-Säurefuchsin-Nährboden in einem Fall 38 Proz., in zwei anderen 2,8 und 4 Proz. der auf Agarplatten zur Entwicklung gelangenden Coli-Kolonien. Hervorheben möchte ich schon an dieser Stelle, daß nach meinen Erfahrungen bei der praktischen Untersuchung von Stuhlproben in der überwiegenden Mehrzahl der Fälle die Coli-Bacillen sehr empfindlich gegen Malachitgrün sind und demnach meist nur ein geringer Prozentsatz von ihnen auf dem Malachitgrün-Säurefuchsinagar zu Kolonien auswächst.

Zum Schluß möchte ich noch einen Versuch anführen, in dem ich Agarplatten, Drigalski-Platten und den Säurefuchsin-Nährboden mit Typhus- und Coli-Bacillen sowie mit Staphylokokken besäte, um sodann die zur Entwicklung gelangten Keime zu zählen. Nachdem die Platten 14 Stunden im Brutschrank bei 37° C gestanden hatten, zeigte sich folgendes: Alle drei Agarplatten waren gleichmäßig bewachsen; auf den mit Typhusbacillen besäten Malachitgrün-Säurefuchsin- und Drigalski-Platten zeigten sich zahlreiche kleine Kolonien. Die mit Coli-Bacillen besäte Drigalski-Platte zeigte zahlreiche, bereits bis über 3 mm im Durchmesser große Kolonien, während die entsprechende Malachitgrün-Säurefuchsinplatte noch kein Wachstum erkennen ließ. Die mit Staphylokokken besäten Malachitgrün-Säurefuchsin- und Drigalski-Platten wiesen keine Kolonien auf. 24 Stunden später waren auf der mit Coli-bacillen beimpften Malachitgrün-Säurefuchsinplatte Kolonien gewachsen, die jedoch noch jetzt erheblich kleiner waren, wie die Coli-Kolonien auf der Drigalski-Platte 24 Stunden früher. Auf der mit Staphylokokken besäten Drigalski-Platte fanden sich einige wenige kleine Kolonien; die entsprechende Malachitgrün-Säurefuchsinplatte zeigte kein Wachstum. Die Zählung der Kolonien ergab folgendes:

Aussaat (Kolonien auf Agar)	Zahl der zur Entwicklung gekommenen Keime			
	auf Drigalski-Agar		auf Malachitgrün-Säurefuchsinagar	
	nach 14 Std.	nach 38 Std.	nach 14 Std.	nach 38 Std.
B. coli 843 Keime	599 = 71 Proz.	—	0	352 = 41 Proz.
B. typhi 13 941	8385 = 60 Proz.	—	12 610 = 90 Proz.	—
Staphylococcus albus 7885	0	20	0	0

Der Ausfall dieses Versuches spricht in hohem Grade für die Ueberlegenheit des Malachitgrün-Säurefuchsin-Nährbodens über den von v. Drigalski und Conradi. Die Typhusbacillen wurden auf beiden Nährböden etwa gleichschnell, auf dem Malachitgrün-Säurefuchsin-Nährboden entwickelte sich eine etwas größere Anzahl von Typhusbacillen zu Kolonien. Das Wachstum von Staphylokokken wurde auf beiden Nährböden etwa gleichgut verhindert. Dagegen verhielten sich die Nährböden den Coli-Bacillen gegenüber sehr verschieden. Auf dem Drigalski-Nährboden entwickelte sich Coli erheblich schneller und üppiger als Typhuskeime, auch überstieg die Verhältniszahl der ausgekeimten Coli-Keime die der Typhuskeime. Im Gegensatz dazu war auf dem Malachitgrün-Säurefuchsin-Nährboden die Entwicklung der Coli-Kolonien deutlich verlangsamt, und der Prozentsatz der Keime, die zu Kolonien auswuchsen, war noch nicht halb so groß wie der der sich entwickelnden Typhusbacillen. Es begünstigt also der Drigalski-Nährboden das Wachstum der Coli-Bacillen, der Malachitgrün-Säurefuchsin-Nährboden das der Typhusbacillen.

Um die Brauchbarkeit des Säurefuchsinährbodens mit Malachitgrün-zusatz für die Praxis zu erproben, habe ich etwa 2 Monate lang, von Mitte Januar bis Mitte März, die zur Untersuchung auf Typhusbacillen, in das Untersuchungsamt für ansteckende Krankheiten des Hygienischen Institutes zu Königsberg einlaufenden Stuhl- und Harnproben neben der Untersuchung auf Endo-Platten auf dem Malachitgrün-Säurefuchsinährboden ausgestrichen. Ich benutzte für die Stuhlproben eine Serie von 3, für die Harnprobe eine solche von 2 Platten.

Obwohl ich bedeutend größere Mengen des Untersuchungsmaterials auf dem Nährboden verarbeitete, als es auf Endo möglich ist, bekam ich doch bei den Stuhlplatten fast stets auf der zweiten Platte, oft auch schon auf der ersten gut isolierte Kolonien; die Urinplatten blieben auch bei Aussaat großer Mengen Urins nicht selten steril, während die ersten Endo-Platten von nicht Coli-artigen Keimen überwuchert waren. Doch auch bei Coli-haltigem Urin und, wie soeben erwähnt, bei den Stuhlproben waren die Resultate derartige, daß mir die schon oben ausgesprochene Annahme gerechtfertigt erschien, daß die Mehrzahl der Coli-Stämme in hohem Grade durch Malachitgrün gehemmt werde, so daß nur ein geringer Prozentsatz von Kolonien sich auf den Malachitgrün-Säurefuchsinplatten entwickelte.

Bei den Untersuchungsproben, in denen sich Typhusbacillen nachweisen ließen, waren die Typhuskolonien auf dem Malachitgrün-Säurefuchsinährboden außerordentlich viel zahlreicher als auf den Endo-Platten, so daß in mehreren Fällen mit dem von der Platte abgestrichenen Material der Agglutinationsversuch im Reagensglas vorgenommen werden konnte.

Hervorheben möchte ich übrigens, daß ich bei meinen Untersuchungen die Pseudoagglutination, die G. Jorus (9) bei auf Malachitgrünplatten gewachsenen Kolonien befürchten zu müssen glaubt, nie beobachtete, wobei ich allerdings bemerken möchte, daß ich die Untersuchung von im hängenden Tropfen von Immunserum verriebenem verdächtigen Material stets nur mit bloßem Auge oder mit einer Lupe vornahm.

In 4 Fällen von den 11 in dieser Zeit positiv ausgefallenen Untersuchungen auf Typhusbacillen waren nicht auf dem Endoschen Nährboden, wohl aber auf den Malachitgrün-Säurefuchsinplatten vereinzelte Typhuskolonien nachzuweisen gewesen. Fälle, in denen auf den Endo-Nährboden Typhusbacillen nachgewiesen werden konnten, während auf den Malachitgrün-Säurefuchsinplatten keine Typhuskolonien gewachsen waren, wurden nicht beobachtet.

Die Farbenreaktion war in der Regel in 14—20 Stunden deutlich erkennbar und die Kolonien dann bereits so groß, daß von ihnen Material zur Agglutination resp. zum Bekämpfen von Agarröhrchen entnommen werden konnte. Nicht zu dicht bewachsene Platten ließ ich bei negativem Befunde meist noch bis zum nächsten Tage im Brutschrank, um etwaige noch in der Entwicklung zurückgebliebene Typhuskolonien größer werden zu lassen.

Eine große Erleichterung bei Benutzung des mit Malachitgrün versetzten Säurefuchsinagars zeigte sich bei den Stuhl- und Urinuntersuchungen darin, daß sehr viele, auf Endo typhusverdächtig aussehende Kolonien, hier die Farbe des Nährbodens nicht geändert hatten, wie sich nach Abimpfen der Kolonien ergab, und somit von vornherein ausschieden. Immerhin kamen nicht selten das Säurefuchsin entfärbende Kolonien zur Beobachtung, doch boten diese teils in dem klaren, durchsichtigen Nährboden nicht das charakteristische Aussehen der Typhuskolonien dar, teils erwiesen sie sich serologisch und kulturell als fremdartige Keime.

Zusammenfassung. Nach dem Ausfall meiner Untersuchungen erscheint mir der Säurefuchsinagar nach E. und A. Kindborg als ein brauchbarer Nährboden zur Untersuchung von Stuhl- und Harnproben auf Typhusbacillen; in seiner Kombination mit Malachitgrün dürfte der Säurefuchsinagar mehr leisten als der Drigalskische und Endosche Nährboden. Vor gewöhnlichen Malachitgrünnährböden hat der Malachitgrün-Säurefuchsinagar den Vorzug, daß durch eine sehr sinnfällige Farbenreaktion die Auffindung vereinzelter Typhuskolonien ermöglicht wird und, dadurch die zeitraubende Vorkultur umgangen werden kann; eventuell könnte die zuerst bestrichene Platte nach dem Verfahren von Tietz und Lentz als Vorkulturplatte benutzt werden.

Da es Typhusstämmen gibt, die von Malachitgrün in höherem Grade gehemmt werden, als manche Coli-Stämme, ist es notwendig, neben dem Malachitgrün-Säurefuchsinährboden noch einen anderen Nährboden zu verwenden. Mein Vorschlag ist daher, bei der Untersuchung auf Typhusbacillen unter Aussaat möglichst großer Mengen von Material, Serien von etwa 7 Platten zu verwenden, von denen die ersten 3 aus Malachitgrün-Säurefuchsinagar bestehen, während zu den übrigen ein die Typhusbacillen nicht hemmender Nährboden, wie der Säurefuchsinagar ohne Malachitgrünzusatz oder der Endosche Agar benutzt werden muß.

Schließlich gestatte ich mir, Herrn Geh. Med.-Rat Prof. Dr. R. Pfeiffer für die Anregung zu dieser Arbeit sowie ihm und dem Leiter des Untersuchungsamtes Herrn Privatdozent Dr. R. Scheller für das meinen Untersuchungen entgegengebrachte Interesse meinen ergebensten Dank auszusprechen.

Literatur.

- 1) Kutscher, Abdominaltyphus. (Kolle-Wassermann. Ergänzungsband I. p. 24.)
- 2) Scheller, R., Tagung der Freien Vereinigung für Mikrobiologie. Berlin 1906. (Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Referate. Beiheft. p. 62/63.)
- 3) Kindborg, E. und A., Ueber eine neue Farbenreaktion zur Erkennung der Typhusbacillen und verwandter Arten im Plattenausstrich. (Ibid. Abt. I. Orig. Bd. CLVI. p. 554.)
- 4) Mankowski, ibid. Bd. XXVII. p. 21.
- 5) Romond, Comptes rend. de la loc. de biol. 1896. p. 883.
- 6) Doebert, A., Wachstum von Typhus- und Coli-Kulturen auf verschiedenen Malachitgrünnährböden. (Arch. f. Hyg. Bd. LIX. p. 370.)
- 7) Löffler, Der kulturelle Nachweis der Typhusbacillen in Faeces, Erde und Wasser mit Hilfe des Malachitgrüns. (Deutsche med. Wochenschr. 1906. p. 289.)
- 8) Nowack, Ueber die Grenzen der Verwendbarkeit des Malachitgrünagars zum Nachweis der Typhusbacillen im Stuhl. (Arch. f. Hyg. Bd. LIII. p. 374.)
- 9) Jorus, G., Ueber die Brauchbarkeit des Malachitgrünnähragars zum Nachweis von Typhusbacillen. (Hyg. Rundschau. 1904. p. 713.)

Inhalt.

Bazzola, Carlo, Können die Muskeln als Bildungsstätte der Antikörper betrachtet werden?, p. 519.
 — —, Sind die Hämolysine und die Cytochrome (Neufeld) verschiedene Substanzen?, p. 522.
 — —, Ueber die bakteriolytischen Eigenschaften des Paratyphus-B-Immunserums, p. 541.
Doepner, Ueber den Wert des Kindborgschen Säurefuchsinagars für die Typhusdiagnose, p. 552.
Geilinger, H., Ueber einen eigenartigen,

paratyphusähnlichen, Gelatine langsam verflüssigenden Bacillus bei einer Furunculosis nach fraglicher Infektion mit Loefflerschem Mäusetyphus, p. 497.
Pfeiffer, R. und Ungermann, E., Zur Antitoxinfrage bei der Dysenterie, p. 534.
Rommeler, Ueber Befunde von Paratyphusbacillen in Fleischwaren, p. 501.
Scheller, R., Ueber die Verbreitung der Influenzabacillen. Eine epidemiologische Studie, p. 503.
Ungermann, E., Untersuchungen über Appendicitis, p. 513.

Nachdruck verboten.

Beitrag zum Studium der Morphologie des Streptococcus.

[Kgl. Chirurg, Institut in Florenz (Direktor: Prof. E. Burci).]

Untersuchungen

von Dr. **Domenico Taddel**,

Professor der chirurg. Pathologie am R. Istituto di Studi Superiori in Florenz.

Mit 3 Figuren.

Ein Problem von großer Wichtigkeit, das bis jetzt noch nicht in befriedigender Weise gelöst worden ist, besteht in der Frage nach den Entstehungsbedingungen und der Bedeutung einiger Bakterienformen, die allgemeiner unter dem Namen Involutionsformen oder teratologische Formen bekannt sind.

Daß einige Bakterien unter bestimmten, von den gewöhnlichen mehr oder weniger verschiedenen Lebensbedingungen ihr morphologisches Aussehen ändern können, ist schon lange bekannt.

Schon Nägeli hatte einige morphologische Modifikationen von Bakterien studiert, die er als involutive erklärte; sodann hatten Wasserguth durch seine Forschungen bezüglich der Morphologie des *Micrococcus prodigosus*, Guignard und Charrin durch das Studium des *B. pyocyaneus*, Zopf durch das der *Cladothrix dichotoma* Johns und der *Beggiatoa* wichtige Daten für das Studium der morphologischen Veränderlichkeit der Bakterien (Pleo- oder Polymorphismus) geliefert.

In jüngster Zeit sind nicht wenige Beiträge zur Aufklärung dieser Frage veröffentlicht worden; sie bringen jedoch verhältnismäßig wenig Neues. Viele Autoren haben sich darauf beschränkt, die unter bestimmten Bedingungen von ihnen konstatierten Veränderungen der Form einfach zu beschreiben, ohne sich auf ein gründliches Studium dieser Veränderungen einzulassen.

Mehrere Autoren haben direkt oder indirekt die Auffassung beäufert, daß einige morphologische Modifikationen der Bakterien als solche von involutiver Natur betrachtet werden müssen. Schürmayer behauptet, die Konstanz der Form der Bakterienarten anzunehmen, sei in Unsinn. Schwalbe ist der Ansicht, nicht nur künstliche Kulturmittel, sondern auch die Vorgänge der natürlichen Auswahl könnten die Merkmale einer Bakterienart modifizieren. Lepoutre gelang es, den Übergang von gewöhnlichen Bakterien in parasitische Bakterien einiger Pflanzen zu bewirken.

Die Bedingungen, unter denen mit einer gewissen Beständigkeit Veränderungen der Form der Bakterien bewirkt werden können, sind entweder physikalischer oder chemischer Art. Die letzteren scheinen von größerer Wichtigkeit zu sein als die ersteren.

Für eine wichtige Ursache der Entstehung der sogenannten Involutionsformen hat man vor allem die Dürftigkeit des Nährsubstrats gehalten; dadurch würden sich die bei einigen längere Zeit in einem und demselben Kulturmittel gezüchteten Bakterien beobachteten Formveränderungen erklären. Es ist jedoch wahrscheinlich, daß unter solchen Bedingungen durch Einwirkung der Bakterien selbst chemische Ver-

Änderungen des Nährsubstrats selbst eintreten, wodurch die Bildung von Substanzen erfolgt, die entweder für die Ernährung der Bakterien nicht geeignet sind, oder in anderer Weise auf das Leben der Keime selbst einwirken. So brachte z. B. Buchner die von ihm beim *Bac. subtilis* und beim *Bac. anthracis* beobachteten Formveränderungen in Beziehung zu dem Ueberschuß der in den Nährsubstraten enthaltenen zuckerhaltigen Stoffe gegenüber den stickstoffhaltigen.

Die Einwirkung einiger Stoffe scheint eine besonders wichtige Rolle für das Eintreten morphologischer Veränderungen bei den Bakterien zu spielen. Wasserzug sah, daß die Hinzufügung von kleinen Dosen von Weinsteinsäure auf den Kulturböden des *B. pyocyaneus* die Bildung von Formen veranlaßte, die von den gewöhnlichen sehr verschieden waren.

Gamaleja, durch den diese Studien sehr gefördert wurden, sah, daß eine der Weinsteinsäure und im allgemeinen kleiner Dosen von Antiseptics ähnliche Wirkung bei Hinzufügung von Kaffein und Lithiumsalzen zu den Kulturmitteln eintrat.

Maassen, der das Studium der Einwirkung der Lithiumsalze auf mehr als 50 Bakterienarten ausdehnte, bemerkte bei den unter diesen Bedingungen entwickelten Keimen das Erscheinen von Kapseln, Vergrößerung des Durchmessers bei Zellen, Anschwellungen an den Enden etc.

Trincas studierte die Einwirkung des Kaffeins auf *B. coli*, den Typhusbacillus und den Bacillus der Dysenterie; er erhielt Formen, auf Grund deren er voneinander verschiedene Stämme dieser Bakterien unterscheiden konnte.

Sind nun die durch Einwirkung dieser Stoffe erhaltenen Formen als Involutionsformen (Nägeli), oder, wie Maassen annimmt, als teratologische zu bezeichnen? Der Auffassung, daß es sich um degenerative Formen handle, denen die Bakterien infolge mangelhafter Ernährung entgegengingen, stellte Gamaleja eine andere Erklärung entgegen. Seiner Ansicht nach handelt es sich um einen an die chemische Zusammensetzung des Nährsubstrates gebundenen Heteromorphismus. Bezüglich der Bakterien sollte sich derselbe Vorgang abspielen, wie ihn z. B. Herbst bezüglich der Entwicklung der Larven des Meerigels beobachtet hatte; die Hinzufügung von neutralen Salzen zu dem Wasser, in dem diese Larven lebten, veranlaßte die Bildung der bis dahin unbekannten Eier des Meerigels.

Die so erhaltenen neuen Formen könnten dazu dienen, den Zyklus der Entwicklung der Keime zu erklären und verwandtschaftliche Beziehungen zwischen Bakterien zu entdecken, von denen man bis jetzt geglaubt hat, sie ständen einander sehr fern. Daß diese Beziehungen nicht so einfach sind, wie man glauben könnte, wenn man an die von den verschiedenen Bakterienformen unter den gewöhnlichen Bedingungen der Entwicklung dargebotenen Merkmale denkt, ist klar erwiesen, auch durch die neueren Forschungen, denen z. B. der Nachweis gelungen ist, daß der Bacillus der Tuberkulose, der Rotzbacillus und der Bacillus der Diphtherie zur Gruppe der Streptothricheen gehören.

Von diesen Erwägungen ausgehend und in Anbetracht der Tatsache, daß diese Frage der Biologie der Bakterien in der heutigen wissenschaftlichen Literatur verhältnismäßig geringe Berücksichtigung erfahren hat, glaubte ich, es würde nicht uninteressant sein, einige diesbezüglich Untersuchungen anzustellen. Ich bin überzeugt, daß jeder, wenn auch bescheidene Beitrag eine gewisse Bedeutung haben kann.

Meine Untersuchungen beschränkten sich auf das Studium des Streptococcus.

Bekannt ist, daß die Streptokokken mit einer gewissen Leichtigkeit auf den gewöhnlichen, besonders aber auf flüssigen Nährböden Zellformen darbieten, die sich von den gewöhnlichen unterscheiden. Noch häufiger kann man beobachten, daß ein Element oder mehrere Elemente einer Kette vergrößerte Durchmesser zeigen.

Zuweilen erscheinen diese Zellen nicht kugelförmig, sondern oval oder von unregelmäßigem Kontur. In anderen Fällen ergeben sich infolge scheinbarer oder wirklicher Verschmelzung benachbarter Elemente Bildungen von Pseudobacillen etc. (Macé).

Welchen Gesetzen der Streptococcus gehorcht, die uns diese Variabilität in seiner Morphologie erklären könnten, wissen wir nicht. Vincent behauptet, daß die morphologischen Merkmale des Streptococcus im Verhältnis zur Reaktion der Nährsubstrate verschieden sind. So z. B. sollen sie in neutraler Bouillon eine Trübung verursachen, unter dem Mikroskop Ketten von mittlerer Länge bilden, und in schwach angesäuertem Bouillon Kulturen von flockigem Aussehen und kurze Ketten ergeben. Apfelsäure, Weinsäure und die sauren Phosphate sollen eine deutliche Wirkung auf die Niederschlagung des Streptococcus und auf die Bildung von langen Ketten ausüben. Die spontanen Veränderungen der Form, die in veralteten Kulturen eintreten, sollen durch die Säure des Nährsubstrats herbeigeführt werden, welche von der Milchsäure herrührt, die der Streptococcus selbst erzeugt.

* * *

Bei meinen Untersuchungen verwendete ich drei Gruppen von Streptokokken, die ich vom bakteriologischen Laboratorium Král in Prag bezogen hatte; es waren dies Streptococcus pyogenes, Streptococcus des Erysipels und Streptococcus choreae.

Die morphologischen und kulturellen Merkmale dieser auf verschiedenen festen und flüssigen Nährböden gezüchteten Keime sind dieselben, wie sie gewöhnlich in den Lehrbüchern der Bakteriologie beschrieben werden; ich sehe deshalb von einer solchen Beschreibung ab. Die Untersuchungen an den auf festen Nährböden gezüchteten Streptokokken habe ich bald aufgegeben, da es mir nicht gelang, unter diesen Bedingungen erwähnenswerte Modifikationen in ihrer Morphologie zu konstatieren.

Deshalb richtete ich meine Aufmerksamkeit auf das Studium der auf flüssigen Nährsubstraten gezüchteten Streptokokken.

Diese Untersuchungen können in drei Reihen eingeteilt werden:

1) Morphologische Untersuchungen der oben erwähnten Streptokokken, die von wenigen Stunden bis zu ca. 4 Monaten bei 37° im Thermostaten gehalten und in einfacher Bouillon sowie in mit Laktose oder Glycerin versetzter Bouillon gezüchtet wurden.

2) Morphologische Untersuchungen derselben Streptokokken, die während der gleichen Zeit und stets bei 37° in einfacher, mit Laktose und Glycerin versetzter Bouillon gezüchtet wurden, die aber mit $\frac{1}{4}$ oder $\frac{3}{4}$ destill. Wasser verdünnt wurde.

3) Morphologische Untersuchungen der unter den erwähnten Bedingungen gehaltenen Streptokokken, die aber in neutraler peptonisierter Bouillon gezüchtet wurden, der 0,25, 0,50 und 1-proz. Weinsäure, Lithiumchlorid und Kaffein hinzugesetzt worden war.

Bei den im vorstehenden erwähnten Untersuchungen habe ich von der Erwärmung des Reagensglases behufs Fixierung und Färbung der in ihm befindlichen Keime abgesehen, um zu verhindern, daß unter Einwirkung der Wärme künstliche Formen entstanden. Ich zog vor, die Fixierung durch einfaches Austrocknen an der Luft vorzunehmen, wenn ich stabile, in Balsam oder Glyzerin eingebettete Präparate erhalten wollte.

Dagegen erhielt ich eine große Zahl von Präparaten, indem ich auf dem Deckglas eine Oese Kultur in einem Tropfen sterilen Wassers verdünnte, dem ich eine oder wenige Oesen färbender Substanz (Ziehlsches Fuchsin, Nicollesches Thionin etc.) hinzufügte, worauf ich ohne weiteres das Glas des Objektträgers auflegte und sogleich die Untersuchung begann.

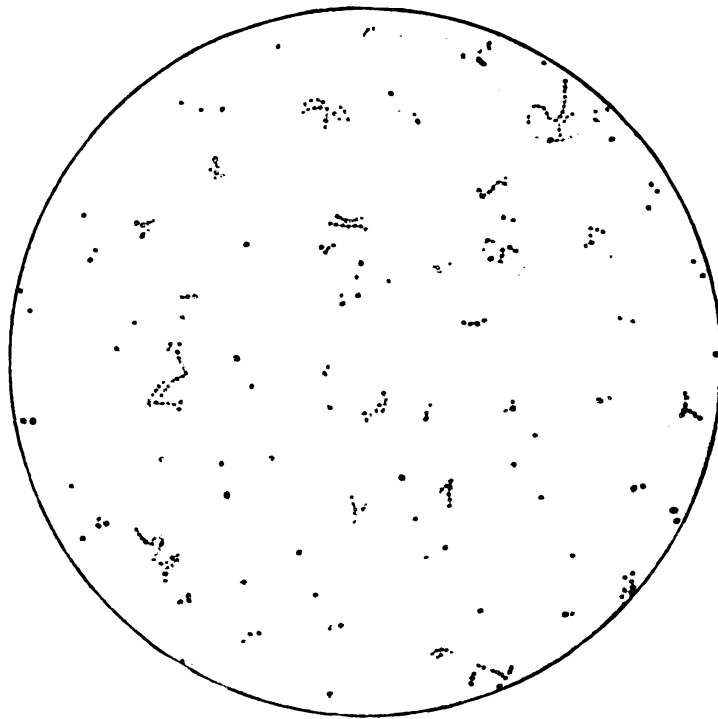


Fig. 1. Streptococcus pyogenes. Fleischbrühe mit Laktose. $3\frac{1}{2}$ Monate.
Mikr. Leitz-Immers. $\frac{1}{18}$ Ok. Komp. 8.

Um mich zu vergewissern, ob in den Bakterienzellen Fetttröpfchen vorhanden seien, fertigte ich zahlreiche, mit Sudan III gefärbte Präparate an; auch färbte ich zahlreiche Präparate mit Blau 1 und Eosin, um die mögliche Anwesenheit von metaplasmatishen Granula von Babes resp. von basophilen oder acidophilen Granula zu erkennen.

Hier folgen in aller Kürze die Resultate meiner Beobachtungen.

Bei der ersten Reihe von Untersuchungen beobachtete ich geringe morphologische Veränderungen, und auch diese erst nach langer Zeit (1 Monat und später), obgleich die zuerst leicht alkalischen Bouillons allmählich eine stets deutlicher hervortretende Säure erlangt hatten. Dies gilt für alle drei Keime, deren Verhalten ich beobachtete; bei keinem von ihnen konnte ich in dieser Beziehung irgendeinen Unterschied wahrnehmen.

Die kleinen Ketten (Fig. 1) nahmen gewöhnlich mit der Zeit immer mehr an Länge ab, so daß in den ältesten Kulturen die von 3—5 Elementen überwogen. In mäßiger Anzahl waren zu 2 Elementen vereinigt.

Streptokokken wahrzunehmen, oder auch isolierte Elemente. Die längsten Ketten zeigten die Tendenz, sich in sich selbst zusammenzuballen. Die Form und das Volumen der Zellen hatten sich wenig verändert. Nur wenige Elemente zeigten eine kleine Zunahme ($1\ \mu$) des Durchmessers; ich bemerkte keine nennenswerten Unregelmäßigkeiten in der kugelförmigen Form der einzelnen Elemente, außer daß einige eine ovale Form zeigten. Sie färbten sich immer gut; nur hier und da wurden einige Elemente zwischen etlichen kleinen Ketten schwach gefärbt. Niemals bemerkte ich im Innern der verschiedenen Elemente mit Sudan III, Blau I oder Eosin färbbare Granula.

Bei der zweiten Reihe von Untersuchungen waren die morphologischen Veränderungen beträchtlicher und wichtiger, wobei sich jedoch

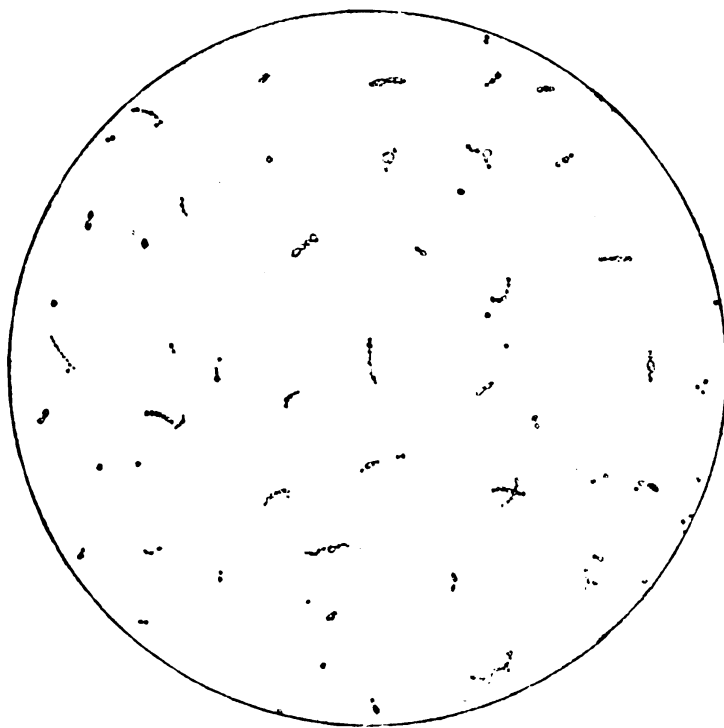


Fig. 2. Streptococcus pyogenes. Fleischbrühe mit $\frac{3}{4}$ H_2O . 3 Monate.
Mikr. Leitz-Immers. $\frac{1}{16}$ Ok. Komp. 8.

kein Unterschied zwischen den verschiedenen untersuchten Keimen zeigte.

Die kleinen Ketten waren, je nachdem immer ältere Kulturen untersucht wurden, von bedeutend geringerer, wenn auch sehr veränderlicher Länge; im allgemeinen waren keine Ketten wahrzunehmen, die aus mehr als 15 oder 20 Elementen bestanden, während die zu 2—3 vereinigten oder isolierten Elemente häufig waren. Die längsten Ketten waren gewöhnlich linienförmig oder zeigten etwas unregelmäßige Kurven.

Die Elemente von normaler Form und normalem Volumen überwiegen stets; schon in 15—20-tägigen Kulturen beginnen sie zu erscheinen, und in älteren Kulturen (Fig. 2) trifft man in mäßiger Zahl (ohne daß sich bedeutende Unterschiede zeigen zwischen Kulturen, deren Bouillon zur Hälfte oder zu einem Viertel verdünnt worden ist) Elemente, deren Form und Volumen ganz verschieden sind von denen, die man in

nur wenige Tage alten Kulturen antrifft. Vor allem beobachtet man Elemente von größerem, doppeltem, und bisweilen noch größerem Volumen, nämlich von einem Durchmesser von 4—5 μ . Ihre Form ist verschieden: Selten erscheinen sie kugelförmig, häufiger oval; bei einigen ist die Andeutung einer Einschnürung in der Mitte wahrzunehmen, so daß sie eine biskuitähnliche Gestalt annehmen. Die von größerem Durchmesser erscheinen weniger intensiv gefärbt; sie finden sich entweder isoliert oder zu kleinen Ketten von 2—3 Elementen vereinigt, oder endlich zu je 1 oder 2 in kleine Ketten eingeschoben, die im übrigen aus kleineren Elementen bestehen.

Wenn diese größeren Elemente untereinander vereinigt oder in den kleinen Ketten eingeschaltet sind, so sind sie gewöhnlich mit der größten Achse des Ovals in die Längsachse der Kette eingefügt; in einer gewissen Zahl von Fällen, namentlich wenn es sich um Elemente von mäßigen, aber nicht riesigen Dimensionen handelt, finden sie sich auch wohl mit der größten Achse des senkrechten Ovals in die Achse der Kette eingefügt.

Bei einigen Präparaten konnte ich auch die Anwesenheit von Formen von bacillenartigem Aussehen konstatieren, die so groß wie 3—4 vereinigte Kokken waren; bisweilen war es möglich, gleichsam eine leichte Verzierung der Ränder wahrzunehmen, die den Gedanken nahelegte, daß es sich um einander sehr nahegerückte oder untereinander verschmolzene Elemente handle.

Ein negatives Resultat ergaben die Forschungen nach dem Vorhandensein einer Kapsel, nach basophilen oder mit Sudan III färbbaren Granula im Innern der Elemente, auch in denen, die größere Dimensionen zeigten.

Bei der dritten Reihe von Untersuchungen waren die morphologischen Veränderungen sehr bedeutend; doch zeigten sich auch hier keine Unterschiede bei den verschiedenen von mir untersuchten Keimen.

In den auf den verschiedenen obenerwähnten Nährböden erhaltenen Kulturen zeigte sich die Bildung eines weißlichen flockigen Niederschlags, der besonders reichlich war in den Bouillons mit 0,50 Proz. Weinstein-säure und 0,50 Proz. Lithiumchlorid, spärlich in denen mit 1 Proz. Weinsteinsäure. Bei den Bouillons mit 1 Proz. Lithium erhielt ich eine, wenn auch spärliche, Entwicklung des *Streptococcus* des Erysipels, und eine sehr spärliche des *Streptococcus pyogenes*. Unter diesen Bedingungen zeigte sich keine Entwicklung des *Streptococcus choreae*.

In den Bouillons mit Kaffeein erhielt ich die Bildung eines spärlichen staubartigen Niederschlags vom *Streptococcus pyogenes* und von dem des Erysipels. Der *Streptococcus choreae* kam hier nicht zur Entwicklung; auch in den Bouillons mit 1 Proz. Kaffeein entwickelte sich keiner der drei genannten Keime.

Minimale oder gar keine morphologischen Veränderungen, die auf jeden Fall sich nicht von den in gewöhnlicher Bouillon erhaltenen unterscheiden, konnte ich bei Untersuchung der Streptokokken wahrnehmen, die sich in den mit Kaffeein bereiteten Bouillons entwickelten.

Dagegen zeigten die in Bouillon mit Weinsteinsäure und Lithium entwickelten Keime schon nach 5—10 Tagen, um so mehr aber nach Verlauf einer längeren Zeit, sehr bemerkenswerte Veränderungen ihrer Form. Keine wesentlichen Unterschiede, außer numerischen, die auch nur wenig hervortraten, waren vorhanden, ob nun dieser oder jener

Keim bei den Untersuchungen verwendet wurde, mochte er in (namentlich saurer) Weinsteinbouillon gezüchtet werden oder in (entschieden alkalischer oder nach einer gewissen Zeit neutral reagierender) Lithiumbouillon.

Das Volumen fast aller Elemente zeigte sich vergrößert, so daß einige ein wahrhaft riesiges Aussehen gewannen, da ihr größter Durchmesser sogar 6—7 μ und mehr erreichte. In den älteren Kulturen waren Ketten von 4—10 Elementen vorherrschend, doch waren auch Ketten von 20—30 Elementen nicht selten; auch fanden sich häufig isolierte, oder zu 2 oder 3 beisammenliegende Elemente.

Die Ketten waren gewöhnlich einfach, d. h. nicht linienförmig verästelt, oder mit wenig komplizierten Formen (Fig. 3).

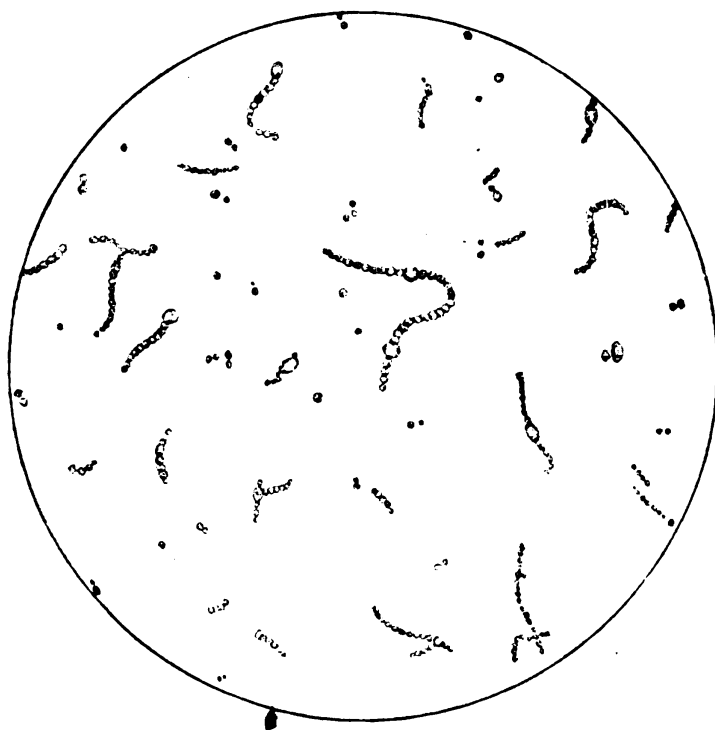


Fig. 3. *Streptococcus pyogenes*. Fleischbrühe mit 0,5-proz. LiCl. 2 Monate.
Mikr. Leitz-Imm. $\frac{1}{16}$ Ok. Komp. 8.

Die Elemente von größerem Volumen befanden sich bald an der Spitze der Ketten, bald wieder zwischen Elementen von geringerem Durchmesser eingeschaltet. Die Riesenelemente dagegen waren nicht in einer verschieden großen Zahl von weniger umfangreichen Elementen isoliert, sondern zuweilen zu je 2 oder 3 vereinigt und in eine Kette eingeschaltet. In anderen Fällen hatten alle Elemente einer Kette einen mehr oder weniger gleichförmigen, ansehnlichen Durchmesser. Bei einigen Ketten wurde der Durchmesser der Elemente, aus denen sie bestanden, in ziemlich regelmäßiger Weise immer geringer; die größten Zellen befanden sich bald an der Spitze, bald wieder mitten in der Kette.

Außer dieser Veränderung hinsichtlich des Volumens der Elemente und der Beziehung, in welcher die voluminöseren Elemente zu den weniger voluminösen stehen, zeigten sich bei dieser Reihe derartige Veränderungen der Form, daß es, wenn man nicht die Herkunft kannte

und wenn die Uebergangsformen von diesen zu den normalen ähnlichen Formen nicht existierten, sehr schwer halten würde, bei der Untersuchung eines Präparates zu glauben, daß es sich um Streptokokken handle (Fig. 3).

Die größeren Elemente behalten eine kugelförmige, meist ovale Gestalt; bisweilen zeigt sich die Andeutung einer Einschnürung in der Mitte, so daß sie die Form eines kurzen und dicken Biskuits haben. Viele Elemente dagegen zeigen statt einer kugelförmigen oder ovalen fast eine viereckige Gestalt mit stumpfen Winkeln.

Die ovalen Elemente sind bald derart vereinigt, daß die größere Achse des Ovals nach der Kette gerichtet ist, zu der sie gehören, bald sind sie wieder mit ihrer größeren Achse in senkrechter Richtung angeordnet. In dem Maße, wie diese Elemente allmählich an Volumen zunehmen, erscheinen sie weniger intensiv gefärbt; in ihrem Innern läßt sich keine besondere Struktur nachweisen und an ihrer Peripherie ist keine Kapsel vorhanden.

Die sowohl in verdünnter Bouillon als auch in Weinstein- oder Lithiumbouillon erhaltenen Formen verschwinden oder nehmen wenigstens bedeutend ab, wenn die Streptokokken auf die gewöhnlichen flüssigen (einfache Bouillon, Laktose-, Glycerinbouillon) oder festen (Agar) Nährböden verpflanzt werden, während sie sich entwickeln und ziemlich gut erhalten, wenn sie nach wenigen Tagen immer wieder auf Weinstein- oder Lithiumbouillon verpflanzt werden.

Geschieht die Verpflanzung von Kulturen aus, die 10—15 Tage alt sind, so gelingt es nicht mehr, zu bewirken, daß sie sich irgendwie entwickeln, sei es auf Bouillon von gleicher chemischer Zusammensetzung (mit Weinstein oder Lithium), oder auf gewöhnlicher Bouillon oder auf Agar.

Hinsichtlich der Virulenz der verschiedenen von mir verwendeten Keime habe ich beobachtet, daß die in Weinstein- oder Lithiumbouillon gehaltenen Keime schnell avirulent werden und selbst in beträchtlicher Menge Kaninchen injiziert werden können, ohne weder lokale, noch allgemeine Erscheinungen zu verursachen, die erwähnenswert wären.

* * *

Aus allen diesen Untersuchungen ergibt sich, daß Vincents Behauptung, die Veränderungen, die der *Streptococcus* erleiden kann, ständen in Beziehung zur Reaktion des Kulturmittels, nicht aufrecht erhalten werden kann. Es entsteht ja in einfacher Bouillon, in der der *Streptococcus* seit vielen Tagen vegetiert hat, eine durch Lackmuspachweisbare Säure, die der von Kulturen in Weinsteinbouillon gleich ist oder sie noch übertrifft; während in der ersteren die morphologischen Veränderungen spärlich auftreten, sind sie hingegen in den letzteren beträchtlich und treten früher ein. Während dagegen die bei Kulturen in Weinstein- und Lithiumbouillon eintretenden Veränderungen der Form nach einander ziemlich ähnlich sind, ist die Reaktion der Nährböden offenbar eine verschiedene: In der ersten Zeit ist sie rein alkalisch und wird dann allmählich neutral oder nur schwach sauer in Lithiumbouillon, in der sich der *Streptococcus* entwickelt hat, während die im Augenblick der Aussaat stark saure Weinsteinbouillon mit der Zeit allmählich einen immer höheren Grad der Säure erreicht.

Ich glaube nicht, daß ich auf Grund der Resultate der im vorstehenden besprochenen Untersuchungen eine absolut zuverlässige Er-

klärung geben kann für die Bedeutung der Formveränderungen, die ich bei den von mir studierten Streptokokken beobachtet habe. Ich glaube jedoch, ausschließen zu können, daß sie Involutionsformen in dem gewöhnlich diesem Worte beigelegten Sinne darstellen, d. h. Formen, die verändert sind, weil sie degeneriert und dem Absterben ganz nahe sind.

Nehmen wir aber auch an, daß es sich um Involutionsformen handelt, so ließe sich doch nicht annehmen, daß die von mir und anderen Autoren beim Streptococcus beobachteten und von vielen Bakteriologen bei zahlreichen Bakterien beschriebenen Formveränderungen „ohne Regel und ohne Grenzen“ eintreten, wie viele Bakteriologen angenommen haben. Es ist logisch, anzunehmen, daß die Involutions- und Degenerationsprozesse bei den Bakterien, wie bei allen anderen lebenden Wesen, nach ganz bestimmten Gesetzen vor sich gehen müssen. Sicherlich muß aber die verhältnismäßige Uebereinstimmung, welche die unter sehr voneinander abweichenden Bedingungen erhaltenen Formen darbieten, uns notwendigerweise zu denken geben. Meine Beobachtungen beweisen, daß die in verdünnten Kulturböden oder in Bouillon mit Zusatz von Weinsteinsäure oder Lithiumchlorid erhaltenen Formveränderungen des Streptococcus, sowohl wenn die Reaktion des Nährsubstrats sauer, als auch wenn sie alkalisch ist, nicht in Beziehung stehen zu den besonderen Umständen, die mit dem Aussehen zusammenhängen, das derartige Formen zeigen, sondern vielmehr zu dem frühzeitigen Auftreten der Bildung und der Zahl der veränderten Elemente.

Zu bemerken ist noch, daß man bei Untersuchung der einen oder der anderen von mir beobachteten Streptokokken, wenn sie denselben Bedingungen unterworfen werden, keine schätzenswerten Unterschiede der erhaltenen Formveränderungen, außer was die Zahl betrifft, finden wird.

Rodet hat sehr rationell 3 Arten von Formveränderungen der Bakterien unterschieden: 1) Eigentliche morphologische Veränderungen, die auch dann bleiben, wenn die Bedingungen aufhören, unter denen sie entstanden sind; 2) Polymorphismus, der an die Entstehungsbedingungen gebunden ist; die stattgefundenen Veränderungen verschwinden, wenn die Bedingungen, unter denen sie eingetreten sind, ausgeschlossen werden; 3) individuelle Unterschiede, die man bei einigen Individuen einer und derselben Varietät beobachtet, wenn sie unter Bedingungen gehalten werden, die bei den anderen Individuen derselben Varietät die gleichen sind.

Offenbar wären in meinem Falle die beobachteten Formveränderungen in der zweiten Kategorie der vorstehenden Klassifizierung unterzubringen. Es würde sich um einen Polymorphismus handeln, der an die Entstehungsbedingungen gebunden ist. Obschon die in ihrem morphologischen Aussehen veränderten Keime ihr pathogenes Vermögen Tieren gegenüber verloren haben, behalten sie doch, wenigstens eine gewisse Zeitlang, die Fähigkeit, sich sogar kräftig bei den einander folgenden Verpflanzungen in Nährböden von derselben Natur zu entwickeln. Diese Beobachtungen lassen sich schlecht vereinigen mit der Hypothese eines Involutionsprozesses, um so weniger, wenn man bedenkt, daß bei den gewöhnlichen Kulturen, in denen die Keime abgestorben oder dem Absterben sehr nahe und deshalb nicht mehr verpflanzbar sind, dieser Polymorphismus, den ich bezüglich des Streptococcus aus den Kulturen in Weinstein- oder Lithiumbouillon erhalten konnte, nicht oder wenigstens nicht so zahlreich und so augenfällig zu beobachten ist.

Da nun die Auffassung ausgeschlossen ist, daß der von mir beobachtete Polymorphismus durch einen einfachen Involutionsprozeß zu erklären sei, tritt die Frage an uns heran, welche Bedeutung er haben kann.

Eine beträchtliche Zahl von Bakteriologen unterscheidet im Bakterienleben einen normalen Zyklus, nämlich denjenigen, welcher sich beim Optimum der Ernährungsbedingungen zeigt, und einen abnormen Zyklus oder Zyklus der gestörten Bildung (wie in neuerer Zeit Mangin sich ausdrückt), den man beobachten kann, wenn die Bedingungen des Kulturmittels auf die eine oder andere Weise verändert sind (Gasperini).

Dieser abnorme Polymorphismus ist gewöhnlich, wie auch meine Untersuchungen an den Streptokokken beweisen, für die verschiedenen Keime charakteristisch.

Ich bin der Ansicht, daß die oben erwähnte Unterscheidung angenommen werden muß und daß die von mir bezüglich des Streptococcus beobachteten Formen durch einen abnormen Zyklus des Lebens zu erklären sind, den ich aus den oben angeführten Gründen nicht mit einem Involutionszyklus verwechseln kann.

Gasperini zieht aus dem Studium der abnormen Formen, die er künstlich durch Modifikation der Nährböden beim *Actinomyces albus* erhalten hatte, die Folgerung: „Die wahrgenommenen abnormen Formen zeigen die Tendenz, die Merkmale höherer Arten anzunehmen; meines Erachtens sind sie nicht als Spiele der Natur, sondern vielmehr als Andeutungen einer Rückkehr zu ursprünglichen und deshalb höher stehenden Typen im Dienst der Fortdauer der Art zu betrachten“.

Diese Auffassung, daß atavistische Merkmale unter jenen besonderen Bedingungen wieder erscheinen, unter denen es logisch ist, daß von Seite der Bakterien, wie Gasperini sich ausdrückt, „eine letzte Kraftanstrengung zu ihrer Erhaltung“ gemacht wird, scheint mir die annehmbarste zu sein.

Denken wir nur an die abnormen oder monströsen Produkte der komplizierten organisierten Wesen, bei denen es möglich ist, zu erkennen, daß die von einem Individuum dargebotenen morphologischen Veränderungen ihr Gegenstück in mehr oder weniger fernliegenden phylogenetischen Stadien finden. Ich halte es deshalb nicht für unlogisch, diese Auffassung auf so einfach organisierte Wesen wie die Bakterien zu übertragen.

Wenn es auch bei einigen Keimen, wie z. B. beim *Actinomyces*, möglich gewesen ist, zu erkennen, auf welche ancestrale Formen die im abnormen Zyklus ihres Lebens angenommenen Formen zurückzuführen sind, so muß ich doch zugeben, daß es nicht immer leicht sein wird, festzustellen, welches die Vorfahren sind, auf welche die erhaltenen abnormen Formen sich zurückführen lassen.

Was aber den Streptococcus betrifft, so glaube ich, daß die ancestralen Formen, auf welche diese von mir beobachteten abnormen Formen zurückgeführt werden könnten, durch die Nostocaceen repräsentiert werden. Die morphologischen Aehnlichkeiten zwischen den Keimen, die ich namentlich in den Kulturen auf Weinstein- und Lithiumbouillon erhielt, und einigen Nostocaceen sind wirklich auffallend. Bekannt ist übrigens, daß Van Tieghem und andere Autoren die Bakterien in eine Klasse zwischen den Algen und den Nostocaceen eingereiht haben: sie würden eine parallele Reihe zu der der chlorophylllosen Elemente darstellen.

Wenn das Studium der abnormen Formen der Bakterien auf eine große Zahl von Arten ausgedehnt wird, so könnte es vielleicht auf Grund der im vorhergehenden erörterten Auffassung uns nicht nur von Nutzen sein, um die Verwandtschaft zwischen gewissen, als neu beschriebenen (Mangin) Arten oder Varietäten zu erkennen, sondern es würde vielleicht auch im angedeuteten Sinne die oben angeführte Auslegung fest begründen, die meines Erachtens der Involutionstheorie vorzuziehen ist.

Literatur.

- Nägeli, Untersuchungen über niedere Pilze. 1878.
 Wasserzug, Variations durables de la forme et de la fonction chez les bactéries. (Ann. de l'Inst. Pasteur. 1888. No. 3.)
 Guignard et Charrin, Sur les variations morphologiques des microbes. (Compt. rend. de l'Acad. d. scienc. 1887. p. 5—12.)
 — —, Sur le polymorphisme des microbes. (Journ. de méd. 1888.)
 Zopf, Zur Morphologie der Spaltpflanzen. 1883.
 — —, Die Spaltpilze. Breslau 1885.
 Cohn, Untersuchungen über Bakterien. (Cohns Beitr. z. Biol. d. Pflanzen. Bd. I. p. 3.)
 Schürmayer, Artenkonstanz der Bakterien und Deszendenztheorie. (Verhandl. d. 70. Versamml. d. Gesellsch. deutsch. Naturf. u. Aerzte. Düsseldorf 1898.)
 Schwalbe, Ueber Variabilität und Pleomorphismus der Bakterien. (Münch. med. Wochenschr. 1900. No. 47.)
 Lepoutre, Recherches sur la transformation expérimentelle de bactéries banales en races parasites des plantes. (Ann. de l'Inst. Pasteur. T. XVI. No. 4.)
 Rodet, De la variabilité dans les microbes. Paris (Baillière) 1894.
 — —, Notes bactériologiques. (Arch. de phys. 1896.)
 Buchner, Beiträge zur Morphologie der Spaltpilze. (Nägeli's Untersuch. üb. niedere Pilze. 1882.)
 Gamaleja, Elemente der allgemeinen Bakteriologie. Berlin (Hirschwald) 1900.
 Maassen, Die teratologischen Wuchsformen (Involutionsformen) der Bakterien und ihre Bedeutung als diagnostisches Hilfsmittel. (Arb. a. d. Kaiserl. Gesundheitsamte. 1904.)
 Trincas, Sulle cosiddette forme eteromorfe e teratologiche dei batteri. (Ann. di Igiene speriment. 1906.)
 Macé, Traité pratique de bactériologie. Paris (Baillière) 1904.
 Vincent, Sur les variations morphologiques du streptocoque et sur un streptocoque ramifié. (Arch. de méd. expér. 1902.)
 Van Tieghem, Traité de botanique. p. 1109.
 Lemoine, Variabilité dans la forme et dans les caractères de culture du streptocoque. (Arch. de méd. expér. 1896. Fasc. 2.)
 Gordon, Characters by which various Streptococci and Staphylococci may be differentiated and identified. (Med. Off. Report Local Govern. Board. No. 33. 1903—1904.)
 Menge u. Krönig, Ueber verschiedene Streptokokkenarten. (Monatsschr. f. Geburtsh. u. Gynäk. Bd. IX. 1899.)
 Le Gros, Monographie des streptocoques et des agents des septicémies métadiphthériques. [Thèse.] Paris 1902.
 Rathien, Versuche über die Virulenzschwankungen von Streptokokken. (Berl. tierärztl. Wochenschr. 1903.)
 Widai et Besançon, Étude de diverses variétés de streptocoques. (Arch. de méd. expér. T. VIII. 1896.)
 Gasperini, G., La biologia e più specialmente il polimorfismo di varie specie di ifomiceti. (Soc. Toscana di scienz. natur. 9 Gennaio 1887.)
 — —, Sul potere patogeno dell'Actinomyces albus e sui rapporti tra actinomicosi e tubercolosi. (Ibid. 7 Luglio 1885.)
 Mangin, Compt. rend. de l'Acad. d. science. T. CXLVII. 1908. No. 4.

Nachdruck verboten.

Ueber das *Bacterium coli mutabile* (Massini) und Coli-Varietäten überhaupt.

Von Dr. Ernst Sauerbeck.

Für die rasche Entwicklung der medizinischen Bakteriologie nach der floristischen Seite hin (die, außer etwa bei Kruse, lange genug zugunsten ihres Gegenstücks, der Immunitätsforschung, vernachlässigt worden ist), mag die Bereicherung unserer Kenntnisse der Darmflora besonders charakteristisch sein.

Neben den praktisch wie theoretisch sehr wichtigen Aufschlüssen über die so lange übersehenen anaëroben Darmbewohner (ich nenne nur den „*Bacillus bifidus*“) hat sie uns die Bekanntschaft zahlreicher Varietäten der Species des *Bacterium coli* gebracht, die gleichfalls ebenso von medizinisch-praktischer, wie allgemein biologisch-theoretischer Bedeutung werden sollte.

Die medizinisch-praktische Bedeutung, die uns hier zunächst liegt, ist eine doppelte: Erstens hat mit den genannten Varietäten die Aetiologie der Darmkrankheiten zu rechnen, wie auch die Aetiologie der mannigfachen infektiösen Krankheiten anderer Organe, die vom Darm in mehr oder minder grober Weise abhängig sind (wie direkt die großen Drüsen, vorzugsweise aber die Gallenblase; dann, durch die Möglichkeit der Ueberwanderung, die Harnorgane, insbesondere beim Weibe; endlich, bei Metastasierung auf dem Lymph- oder Blutwege, beliebige Organe). (Die ätiologische Rolle der Varietäten mag zu einem guten Teil das „Atypische“ vieler Fälle von Infektionen erklären, die lange Zeit durch voreilige Subsumption zu Unrecht alle einem einzigen, seit langem bekannten Erreger zugeschrieben wurden.)

Mit der ätiologischen ist schon ohne weiteres eine zweite, die diagnostische Bedeutung gegeben. Diese wird nun aber dadurch noch erhöht, daß die Varietäten, wie auch die typische Zentralform, das *Bacterium coli sensu strictiori*, sehr oft auch neben den streng pathogenen Formen (wie *Bact. typhi*, *paratyphi A* und *B*) als — wahrscheinlich harmlose — Insassen des Darmes angetroffen werden.

Ueber einen Fall von Darmkrankheit, in dem der bakteriologische Befund in ganz besonderer Weise durch Vorhandensein zahlreicher Coli-Varietäten kompliziert war, in dem aber vor allem eine der Varietäten ganz besonderes Interesse verdient, will ich in folgendem berichten.

Diese letztere Varietät gehört der kürzlich von Neisser-Massini neugeschaffenen Coli-Varietät des *Coli mutabile* an, jener äußerst merkwürdigen Art mit dauernder, gesetzmäßiger „Mutation“, d. h. Herausbildung eines neuen coliarigen Typus aus einem ursprünglichen, in gewissem Sinne mehr typhusartigen. Genauer unten. Hier zunächst die übrigen Tatsachen von Bedeutung.

Der Fundort der Bakterien.

Patientin von 25 Jahren, Dienstmädchen. Mit der Diagnose „Influenza“ ins Spital geschickt; im Journal geführt als „Typhus abdominalis ohne Agglutination des Serums und ohne Typhusbacillen in

Blut, Stuhl und Urin⁴. Blut wurde kulturell (2mal; 14 und 20 Tage nach Beginn) und auf Agglutination (6mal: 14, 20, 27, 36, 44, 63 Tage nach Beginn der Krankheit) in der Klinik untersucht, beides mit ganz negativem Ergebnis; ferner wurde das Blut auf Agglutination, Stuhl und Urin kulturell von mir untersucht.

Eigene Prüfung der Agglutinationsverhältnisse (4 Proben).

1) Serum, vom 27. Tage nach Erkrankung: Gegen Typhus und Paratyphus B und A Agglutination negativ.

2) Serum, vom 36. Tage nach Erkrankung, nach 2-tägigem Stehen, makroskopisch: Gegen Typhus $\frac{1}{20}$ positiv, Paratyphus B und A $\frac{1}{20}$ negativ (nach 5-tägigem Stehen makroskopisch und mikroskopisch Typhus bis $\frac{1}{50}$ positiv), außerdem aber (nach 2-tägigem Stehen makroskopisch) positiv $\frac{1}{20}$ gegen verschiedene typische Coli-Stämme verschiedener Herkunft (aus Cystitisharn, Otitiseiter, Uterussepsis) und gegen 2 Stämme, ganz coliartig, aus Stuhl und Urin der Patientin, gegen ersteren noch positiv $\frac{1}{50}$.

3) Serum, vom 44. Tage nach Erkrankung, nach 14—16-tägigem Stehen, mikroskopisch: Gegen Typhus $\frac{1}{25}$ schwach positiv; ebenso [(oder stärker?) Beobachtung durch Pseudoagglutination erschwert!] gegen ein *Bact. faecalis alcaligenes* (Stamm H, s. unten!) aus dem Stuhl der Patientin, dagegen bis $\frac{1}{100}$ positiv ($\frac{1}{50}$ noch sehr deutlich) gegen Coli aus dem Stuhl der Patientin. Makroskopisch (1 bzw. 2 Tage nachher): Gegen Typhus $\frac{1}{50}$ schwach positiv, gegen die beiden Stämme der Patientin $\frac{1}{50}$ noch sehr deutlich, auch noch $\frac{1}{75}$, besonders gegen den Coli-Stamm (negativ dagegen gegenüber 6 anderen Stämmen aus der Patientin (s. unten: B bis G), sowie gegen Paratyphus A und B, Dysenterie, einen von mir früher isolierten „Pseudoparatyphus“-Stamm (dem Paratyphus B sehr ähnlich, nicht durch Paratyphusserum agglutiniert) und einen der obengenannten Coli-Stämme (aus Cystitis).

4) Serum, vom 63. Tage nach der Erkrankung, Agglutination, makroskopisch, mit dem frischen Serum: Typhus wird nicht mehr agglutiniert, wohl aber — wieder bei negativem Ergebnis, gegenüber den 6 anderen Stämmen aus der Patientin (B bis G) — das Coli und das *Bact. faecalis alcaligenes* aus der Patientin, ersteres bis $\frac{1}{100}$ sehr deutlich, letzteres $\frac{1}{50}$ deutlich (über $\frac{1}{100}$ war nicht verdünnt worden!).

Ergebnis der Agglutinationsprüfung.

Spät, erst beim Beginn der 6. Krankheitswoche, gewinnt das Serum agglutinierende Eigenschaften gegen Typhus, *Bact. faecalis alcaligenes* und Coli, letztere beiden aus der Patientin stammend. Die Agglutination bleibt dauernd schwach — erreicht für Typhus kaum den Titer $\frac{1}{50}$ — wird etwas stärker für *Faecalis alcaligenes*, recht deutlich (Titergrenze über $\frac{1}{100}$) für Coli; ihr Erlöschen ist innerhalb der Beobachtungszeit nur für Typhus, und zwar zwischen dem 44. und 63. Krankheitstag eingetreten; für die beiden anderen Bakterien scheint sich die Agglutination bis zuletzt eher gesteigert zu haben. Am Anfang wurden auch 3 Coli-Stämme anderer Herkunft schwach mitagglutiniert. 6 Stämme aus der Patientin, sowie die bekannteren pathogenen Formen der Coli-Gruppe (Paratyphus B und A, Dysenterie), auch eine atypische Form, zeigten niemals auch nur die Spur einer Reaktion.

Man kann also aus der Agglutination nur auf einen Infektionserreger der Coli-Gruppe schließen, der dem

typischen Coli, Faecalis alcaligenes und Typhus nahesteht.

Kulturelle Untersuchung von Stuhl und Harn.

Es wurden Stuhl und Harn 2mal, am 23. und 38. Krankheitstage eingeschickt; die Untersuchung der 1. Probe ergab Bakterien auch im Harn (der aber ohne Vorsichtsmaßregeln zur Vermeidung von Verunreinigung entnommen war!), die der 2. nur im Stuhl. Die zweite Untersuchung wurde nur bis zur Feststellung der Abwesenheit von Typhusbacillen geführt, die erste bis zu vollständiger Analyse der (aëroben) Stuhl- und Harnflora. Von ihr soll nun die Rede sein.

Die Originalausstriche auf Endo-Agar verrieten sofort einen komplizierten Befund. Es mußten auf den Platten vom Stuhl zunächst, bloß nach Farbe, Größe, Gestalt und Struktur der Kolonien, mindestens 4, auf denen vom Harn 5 Typen unterschieden werden. Die Reinzüchtung ergab 25 Stämme. Das Studium dieser Stämme schien eine Reduktion auf 7 oder 8 Stämme zu ermöglichen. Das „Coli mutabile“ kam als 8. bzw. 9. Stamm erst infolge einer Nachuntersuchung der Originalstuhlplatte (mehrere — etwa 12 — Tage nach dem Ausstrich) dazu.

Ich habe, morphologisch und physiologisch, soweit es durch kulturelle Methoden möglich ist (Tierversuche mußten unterbleiben), die Differenzierung so weit getrieben, als zur Vergleichung mit den bekannten Arten bezw. Artengruppen nötig war.

Die nachstehende Tabelle charakterisiert und differenziert in Kürze die verschiedenen Stämme, A bis H.

Tabelle I.

Kolonien auf Endo: Form	Farbe (Rötung)	Gasbildung aus Zucker	Milchkoagulation	Beweglichkeit	Systematische Stellung
A: Flach, mgr.—gr., trocken	+	+	+	+	Coli-Gruppe
B: Gewölbt, mgr.—gr., schleimig	(+)	+	+	?	Aërogenes-Gruppe
F: Flach, ziemlich gr., trocken	+	0	+	?	? (Nähe Bact. septic. haemor.)
C: Flach, gr., trocken	0	+	+	+!	? (Nähe des Bact. punctatum)
D: Genabelt, gr., schleimig	0	+	+	0	? („ „ „ „ „)
E: Flach, mgr., trocken	0	+	0	+!	Enterit.-Paratyphusgruppe
G: Flach, mgr.—gr., etwas eckig, trocken	0	0	aufgehellt	0?	Faecalis alcaligenes-Gruppe
H: Wie G	0	0	aufgehellt	+	

Es ist der Tabelle zur Ergänzung beizufügen:

1) daß alle Stämme mikroskopisch Kurzstäbchen vom Coli-Typus, negativ gegen Gram, darstellten;

2) daß, außer B und D, alle Stämme auf Gelatine, wie Coli bezw. Typhus, d. h. „weinblattartig“ wuchsen (größer oder zarter), während B und D auf Gelatine ähnlich wie auf Agar wuchsen, wie es, im Gegensatz zur Coli-Typhus-Gruppe der Pneumoniae-Aërogenes-Gruppe eigentümlich ist;

3) daß keiner der Stämme Gelatine verflüssigte;

4) daß eine, freilich etwas summarische Prüfung der Agglutinierbarkeit durch Typhus- und Paratyphus B-Serum ein durchaus negatives Ergebnis hatte. Ferner mag bemerkt sein:

gr. bedeutet groß, mgr. mittelgroß, und zwar bezogen etwa auf die Größe von Staphylokokken als Normalgröße (ca. 2—3 mm).

NB. Die Stämme B, C, D, F, G stammten aus dem Stuhl.

Die Stämme A, E, H stammen aus dem Harn.

Es vertritt Stamm A 9 gleiche oder sehr ähnliche reingezüchtete Stämme

"	"	"	B	1	"	"	"	"	"	"
"	"	"	C	5	"	"	"	"	"	"
"	"	"	D	2	"	"	"	"	"	"
"	"	"	E	1	"	"	"	"	"	"
"	"	"	F	1	"	"	"	"	"	"
"	"	"	G	5	"	"	"	"	"	"
"	"	"	H	1	"	"	"	"	"	"

Die bekannten Arten, mit denen die unserigen verwandt bzw. identisch sein können, nehmen sich, entsprechend charakterisiert, folgendermaßen aus:

Tabelle II.

Bakteriengruppe	Kolonien auf Agar	Rötung auf Endo	Gasbildung aus Zucker	Koagulation der Milch	Beweglichkeit
Gruppe des Bact. pneumoniae	(schleimig)		+	0	0
" " " acidi lactici (aërog.)	(")	+(?)	+	+	0
" " " coli immobile	trocken	+(?)	+	+	0
" " " coli (typicum)	"	+	+	+	(+)
" " " enteritidis	"	0	+	0 wenig Alkali	(+)
" " " paratyphi (A und B)	"	0	+	0 } A wenig Säure wenig Alkali	+!
" " " (faecalis) alcaligenes	"	0	0	0	+
" " " typhi	"	0	0	0	+!
" " " dysenteriae	"	0	0	0	0

Ein Vergleich der beiden Tabellen zeigt, daß nur ein Teil der isolierten Stämme sich den bekannten Untergruppen der großen Hauptgruppe der Pneumoniae-Coli-Bakterien im weiteren Sinne anschließen läßt (zur Coli-Gruppe alle Formen mit weinblattartigen Kolonien auf Gelatine, zur Pneumoniae-Gruppe, die mit gewöhnlich runden Kolonien auf diesem Nährboden gerechnet!); es sind die ersten und die letzten Stämme: A und B dort, E bis H hier. Es blieben übrig F, C und D, von denen, dem Kolonieentypus nach, die ersten beiden zur Coli-, der letzte Stamm zur Pneumoniae-Gruppe gehören.

F hat die Besonderheit, wohl Milch zu koagulieren, wie Coli, aber aus Traubenzucker kein Gas zu bilden, dagegen Endo zu röten; C und D ist eigentümlich, zwar Milch zu koagulieren und Traubenzucker zu vergasen, aber Endo nicht zu röten. Daraus muß man wohl schließen, daß bei C und D die Milchkoagulation auf einem anderen Vorgang als dem in der Aërogenes-Coli-Gruppe (letztere wie erstere im engeren Sinne!) üblichen beruht, nicht nämlich auf Säurebildung aus dem Milchezucker, die ja Rötung des Endo zur Folge haben mußte, sondern Bildung eines Labferments, wie es z. B. für Bact. prodigiosum, das der Coli-Gruppe (im weiteren Sinne) ja wohl nicht sehr fernsteht, nachgewiesen ist und wohl auch, vorläufig wenigstens, für alle Arten angenommen werden muß, die Milch ohne Säuerung koagulieren.

Daß solche Arten von ähnlichem Verhalten, wie es die 3 Stämme F, C, D zeigen, keineswegs unerhört sind, läßt folgende Uebersicht erkennen:

Tabelle III.

	Koagulation der Milch	Reaktion der Milch	Vergasung des Trauben- zuckers	Verflüssigung der Gelatine	Gram	
Bact. coli u. aërogenes	+	sauer	+	0	0	
„ (Proteus) vulgare	+	sauer (sw.)	+	+	+	
„ punct. (aquat. com- mun.)	+	alkal.	+	+	0	In der Nähe St. C u. D! (nur Gelatineverflüssi- gung negativ!)
Staphylokokken	+	t. s., t. amph., t. alkal.	0	+0	+	
Streptokokken	+	sauer	0	0(+)	+	
Sarcinen	+	t. s., t. amph., t. alkal.	0	+0+	+	
Bact. septic. haemorrh.	+	sauer	0	0	0	In die Nähe St. F!
„ prodigiosum	+	„	0	+	0	
„ violaceum	+	„	0	+	+	
„ pyocyaneum	+	amph. später alkal.	0	+	0	
„ erysipel. suum	+	amph.	0	0	+	
Bac. anthracis u. subt.	+	alkal.	0	+	+	
Vibrionen (z. B. V. chol.)	+	„	0	+	0	
„ (seltener)	0	alkal.	0	+	0	
Bact. typhi, dysent., faec. alcal.	0	amph.	0	0	0	
Bact. fluorescens	0	amph., später alkal.	0	+	0	
„ putidum	0	amph.	0	0	0	
„ syncyaneum	0	alkal.	0	0	+	
„ Zopffi	0	alkal. (schwach)	0	0	+	
„ murisept.	0	amph.	0	0	+	
„ enterit., paratyphi	0	„	0	0	0	
„ pneumoniae	0	sauer	+	0	0	

Erklärung der Abkürzungen: sw. = schwach, t. = teils, amph. = amphoter.

Ein Vergleich mit dieser Tabelle erlaubt auch die 3 bewußten Stämme in der Nähe bekannter Typen unterzubringen. Daß Stamm C und D im Gegensatz zum Bact. punctatum, dem sie durch ihr fermentatives Verhalten gegenüber Traubenzucker und Milch entsprechen, Gelatine nicht verflüssigen, kann für die Annäherung kein Hindernis bedeuten; ist doch die Gelatineverflüssigung ein Vermögen, das bei gewissen Formen schwanken kann; insbesondere gilt dies von Formen, die wahrscheinlich zwischen der Coli- und Proteus-Gruppe im weiteren Sinne einzuschalten sind.

NB. Daß es sich bei Stamm G und H nicht um Typhus, sondern um Faec. alc. handelte, zeigte die Milchkultur durch völlige Aufhellung und Bräunung aufs deutlichste.

Für Stamm E konnte die Nichtidentität mit Paratyphus B aus den Agglutinationsverhältnissen erschlossen werden. —

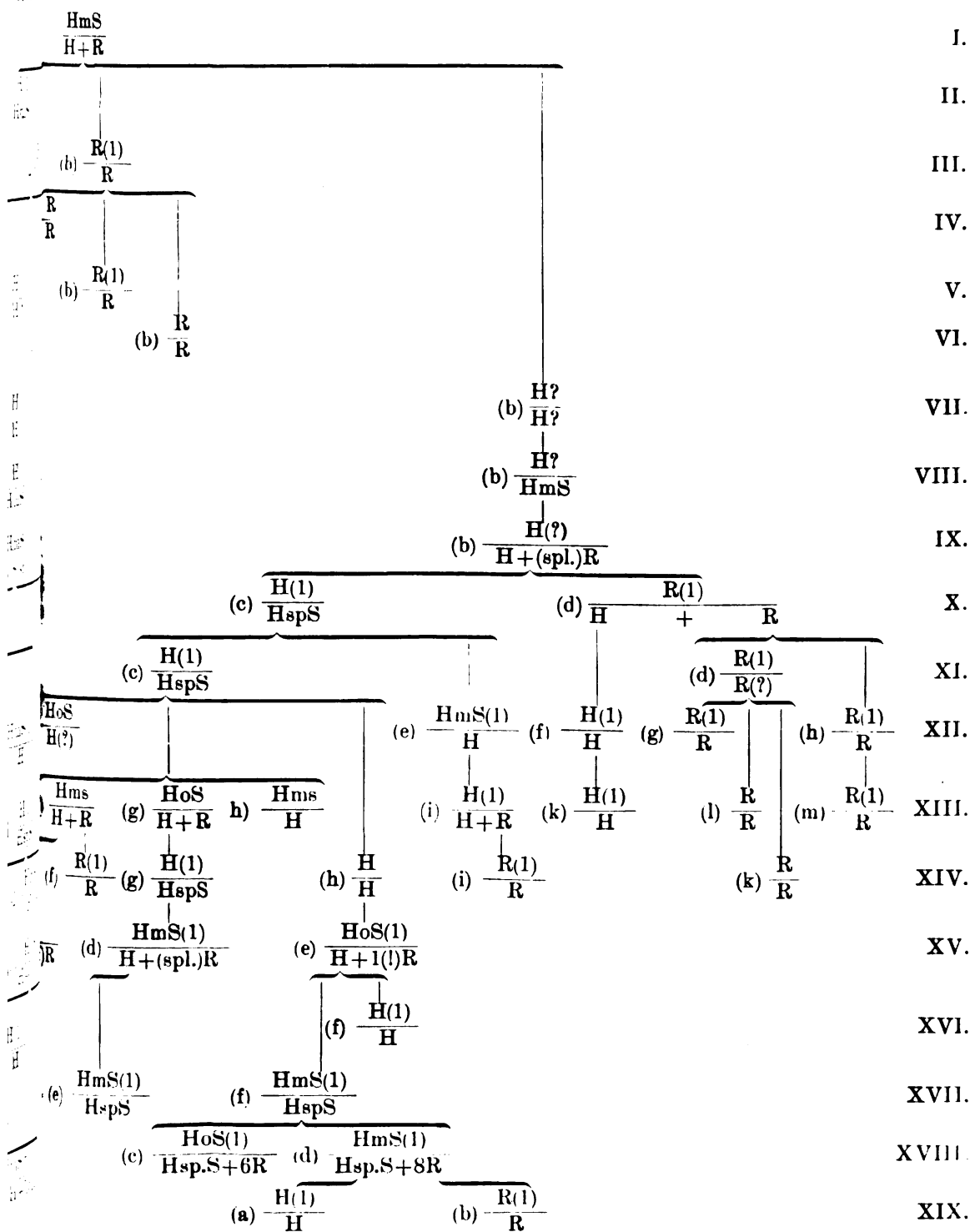
Das **Bacterium coli mutabile**: Daß die Analyse in unserem Falle keine leichte war, geht aus dem Mitgeteilten wohl ohne weiteres hervor. Daß sie aber eine ganz außergewöhnlich schwere war, wird man ermessen können, wenn man sich vergegenwärtigt, daß zu den genannten 7 (8) Typen als letzter das Bacterium coli mutabile (Neisser-Massini) kam. Was die genaue Charakteristik dieses Bakteriums betrifft, so verweise ich auf die sehr zugängliche Originalbeschreibung Massinis.

Was mir nach meiner Meinung die Berechtigung gab, meinen Stamm mit dem neuentdeckten Bakterium der genannten Autoren zu identifizieren, war die Feststellung der zwei wichtigsten Eigentümlichkeiten:

Entwicklung von R.

24. Juli	I.	
25. „	II.	(a) $\frac{H(1)}{HmS}$
26. „	III.	(a) $\frac{H(1)}{H}$
27. „	IV.	
31. „	V.	(a) $\frac{H}{H(?)}$
3. Aug.	VI.	(a) $\frac{H(1)}{H}$
14/15. „	VII.	(a) $\frac{H}{H}$
17. „	VIII.	(a) $\frac{H}{HmS}$
23. „	IX.	(a) $\frac{HmS}{HmS(spl.)}$
28. „	X.	(a) $\frac{HoS(1)}{HspS}$ (b) $\frac{HmS}{H+ver}$
29. „	XI.	(a) $\frac{H(1)}{HspS}$
31. „	XII.	(a) $\frac{H(1)}{HspS}$ (b) $\frac{HmS(1)}{H}$ (c) $\frac{R(1)}{R}$
3. Sept.	XIII.	(a) $\frac{HmS}{H}$ (b) $\frac{HmS(1)}{H+R}$ (c) $\frac{HoS(1)}{H+R}$ (d) $\frac{H(1)}{HspS}$
6. „	XIV.	(a) $\frac{H(1)}{HspS}$ (b) $\frac{H(1)}{H}$ (c) $\frac{HoS(1)}{H}$ (d) $\frac{HmS(1)}{HspS}$
9. „	XV.	(a) $\frac{HmS(1)}{H+ca. \frac{1}{10} R}$ (b) $\frac{HmS(1)}{H+ca. \frac{1}{7} R}$
10. „	XVI.	(a) $\frac{H(1)}{H}$ (b) $\frac{R(1)}{R}$ (c) $\frac{H(1)}{H}$ (d) $\frac{R(1)}{R}$
11. „	XVII.	(a) $\frac{HoS(1)}{H}$ (b) $\frac{R(1)}{R}$ (c) $\frac{HoS(1)}{HspS}$ (d)
16. „	XVIII.	(a) $\frac{HmS(hl)(1)}{H+12R}$ (b) $\frac{HmS(r!)(1)}{H+15R}$
18. „	XIX.	

B. coli mutabile.



- 1) Der Knötchenbildung in (auf Endo) hellen Kolonien,
- 2) der Entwicklung (auf Endo) roter Kolonien aus hellen mit Knötchen.

Eine weitere Untersuchung (durch Kultur- und Tierversuche) mußte zunächst aus äußeren Gründen verschoben werden; leider starb der Stamm ab (bezw. wurde verunreinigt), bevor die Wiederaufnahme der Untersuchung erfolgen konnte. Die Identifizierung dürfte hierdurch kaum fraglich werden.

Es wurde der Stamm, wie oben erwähnt, bei einer Nachuntersuchung der Original-Endo-Platte erhalten. Als ich zum erstenmal die sehr charakteristischen Knötchen gesehen hatte — ich kannte sie dank einer persönlichen Demonstration meines damaligen Basler Kollegen Massini aus eigener Anschauung — nahm ich eine systematische Weiterzüchtung vor. Ihr Ergebnis ist in Tabelle IV niedergelegt.

Jede Impfung (immer auf Endo-Agar) ist durch einen Bruch charakterisiert: Ueber dem Bruchstrich steht die Charakteristik des Ausgangs-(Impf-)Materials; darunter die der aufgehenden Kolonien. Es bedeutet dabei

H = helle Kolonie, d. h. Kolonie vom Typus der Typhuskolonien,

HoS = helle Kolonie ohne Sekundärkolonien (Knötchen),

HmS = helle Kolonie mit Sekundärkolonien (Knötchen),

R = rote Kolonien, d. h. Kolonien vom Typus der Coli-Kolonien,

H + R = helle und rote Kolonien.

sp bedeutet spärlich, HspS, helle Kolonien, unter ihnen spärlich solche mit Sekundärkolonien.

Der Zusatz 1 in Klammern zeigt an, daß von einer einzigen Kolonie abgeimpft wurde. Daß dies nicht immer geschah, hatte — selten — seinen Grund darin, daß isolierte Kolonien nicht vorhanden waren, meist darin, daß, bei mehrtägigem Ausgangsmaterial, die Abimpfung von einer einzigen Kolonie, nach früherer Erfahrung, leicht ein negatives Ergebnis hatte (57mal wurde von 1 Kolonie abgeimpft, 20mal sicher oder wahrscheinlich von einem Kolonienaggregat, die letzten Impfungen leiten sich durchweg von 1 Kolonie ab [5 Generationen!]).

Für das *Bact. coli mutabile* ist nach Massini charakteristisch, daß aus der hellen Urform sich die rote entwickelt, und zwar in folgender Weise: Es treten in den hellen Kolonien nach einiger Zeit Knötchen auf, eben bequem von bloßem Auge sichtbar; sie sind seltener blaß, meist rötlich, zum Teil intensiv rot wie Coli-Kolonien. Wird eine helle Kolonie, bevor sie Knötchen gebildet hat, weiterverimpft, so gehen aus ihr nur helle Kolonien hervor, die aber wieder zur Knötchenbildung befähigt sind; wird die Weiterimpfung aber nach Auftreten der Knötchen vorgenommen, so entsteht eine Saat teils heller Kolonien von den Eigenschaften der Mutterkolonie, teils roter Kolonien, die von gewöhnlichen Coli-Kolonien nicht zu unterscheiden sind. Je mehr man Knötchensubstanz allein verimpft, desto mehr wiegen die roten Kolonien vor, so daß man schließen muß, daß die Knötchen rote Kolonien in nuce sind. Rote Kolonien erzeugen aus sich immer nur wieder rote Kolonien.

Es findet also eine fortdauernde Artneubildung statt, die vom Standpunkt der bekannten Erörterungen von de Vries aus als Mutation zu bezeichnen ist, durch die aus einer Art der Coli-Gruppe, die Milchsucker nicht unter Säurebildung zu zerlegen vermag, eine andere Art entsteht, die hierzu befähigt ist, mit anderen Worten, durch die aus einem Bakterium vom Enteritidis-Paratyphustypus eine Art des Coli-Typus entsteht.

Die Entwicklung der neuen Eigenschaft ist an die Anwesenheit von Milchsucker gebunden. Von milchsuckerfreiem Nährboden können

Tabelle
Analyse des Stamm-

1.	$\frac{H}{H}$	Va(?), VIIa, VIIb(?), XIVh	4	15	17 Fälle von Gleichbleiben des Kol.-Typus auf der niederen Stufe	17 Fälle von Gleichbleiben auf der 1. Stufe	
2.	$\frac{H_1}{H}$	IIIa, VIa, XIIIf, XIIIk, XIVb, XIVe, XVIa, XVIc, XVIe, XVIIf, XIXa	11				
3.	$\frac{HoS}{H}$	XII d(?)	1				
4.	$\frac{HoS(1)}{H}$	XIVc	1				
5.	$\frac{HmS}{H}$	XIIIa, XIIIh	2	4	4 Fälle von Rückwärtsentwicklung des Kol.-Typus von der mittleren Stufe ersten Grades nach der niederen	4 Fälle von Rückwärtsentwicklung, nur von der 2. nach der 1. Stufe	
6.	$\frac{HmS(1)}{H}$	XIIb, XIIe	2				
7.	$\frac{R}{H}$	—	—	0	kein Fall von Rückwärtsentwicklung des Kol.-Typus von der höheren nach der niederen Stufe		
8.	$\frac{R(1)}{H}$	—	—				
9.	$\frac{H}{HmS}$	VIIIa, VIIIb	2	10	13 Fälle von Vorwärtsentwicklung des Kol.-Typus von der niederen nach der mittleren Stufe ersten Grades	13 Fälle von Vorwärtsentwicklung von der 1. nach der 2. Stufe	
10.	$\frac{H(1)}{HmS}$	IIa, Xc, XIa, XIc, XIIa, XIII d, XIVa, XIVg	8				
11.	$\frac{HoS}{HmS}$	—	—				
12.	$\frac{HoS(1)}{HmS}$	Xa, XVIIa, XVIIc	3				
13.	$\frac{HmS}{HmS}$	IXa	1	5	5 Fälle von Gleichbleiben des Kol.-Typus auf der mittleren Stufe ersten Grades	5 Fälle von Gleichbl. auf der 2. Stufe	
14.	$\frac{HmS(1)}{HmS}$	XIVd, XVIIId, XVIIe, XVIIIf	4				
15.	$\frac{R}{HmS}$	—	—	0	kein Fall von Rückentwicklung des Kol.-Typus von d. höheren nach d. mittleren Stufe ersten Grades		
16.	$\frac{R(1)}{HmS}$	—	—				

zunächst immer nur helle Kolonien erhalten werden; doch erhält sich die Eigenschaft, wenn einmal erworben, auch auf Nährböden ohne Milchezusatz. Soweit Massini!

Demnach können wir die Impfungen, die in unserer Tabelle IV verzeichnet sind, in mehrere Gruppen teilen; zunächst in 3, je nachdem eine Vorwärtsentwicklung (vom Enteritidis- zum Coli-Typus), ein Gleichbleiben oder eine Rückwärtsentwicklung des Kolonieentypus festzustellen ist. Diese Gruppen können weiter gegliedert werden, je nach-

V.

baumes von Tab. IV.

17.	$\frac{H}{H+R}$	IX b	1	2	7 Fälle von Vorwärtsentwicklung d. Kol.-Typus von der niederen Stufe nach der mittleren 2. Grades	17 Fälle v. Vorwärtsentwicklung von der 1. oder 2. Stufe nach der 3. Stufe	
18.	$\frac{H(1)}{H+R}$	XIII i	1				
19.	$\frac{HoS}{H+R}$	XIII g	1				
20.	$\frac{HoS(1)}{H+R}$	XIII c, XV c, XV e, XVIII c	4				
21.	$\frac{HmS}{H+R}$	I, XIII f	2	10	10 Fälle von Vorwärtsentwicklung des Kol.-Typus v. d. mittl. Stufe 1. Grades nach d. mittl. Stufe 2. Grad.		
22.	$\frac{HmS(1)}{H+R}$	X b, XIII b, XV a, XV b, XV d, XVIII a, XVIII b, XVIII d	8				
23.	$\frac{R}{H+R}$	—	—	1	1 Fall von Rückwärtsentwicklung des Kol.-Typus von der höheren Stufe nach dem mittleren 2. Grad	1 Fall von Rückwärtsentwicklung v. 4. nach 3. Stufe	
24.	$\frac{R(1)}{H+R}$	X d	1				
25.	$\frac{H}{R}$	—	—	0	kein Fall von Vorwärtsentwicklung des Kol.-Typus von der niederen nach der höheren Stufe	kein Fall von Vorwärtsentwicklung von der 1., 2., 3. Stufe nach der 4. Stufe	
26.	$\frac{H(1)}{R}$	—	—				
27.	$\frac{HoS}{R}$	—	—	0	kein Fall von Vorwärtsentwicklung d. Kol.-Typus von der mittleren Stufe 1. Grades nach der höheren		
28.	$\frac{HoS(1)}{R}$	—	—				
29.	$\frac{HmS}{R}$	—	—	0			
30.	$\frac{HmS(1)}{R}$	—	—				
31.	$\frac{R}{R}$	IV a, V b, VI b, XIII e, XIII l, XIV k	6	19	19 Fälle von Gleichbleiben des Kol.-Typus auf der höheren Stufe	19 Fälle von Gleichbleiben auf der 4. Stufe	
32.	$\frac{R(1)}{R}$	III b, XI b, XI d, XII c, XII g, XII h, XIII m, XIV f, XIV i, XVI b, XVI d, XVII b, XIX b	13				

dem die Vorwärts- oder Rückwärtsentwicklung über eine oder 2 Stufen sich erstreckt, z. B. ob aus hellen Kolonien ohne Sekundärkolonien nur ebensolche mit Sekundärkolonien oder gleich helle Kolonien (mit oder ohne Sekundärkolonien) und rote Kolonien entstehen.

Die Einteilung ist, unter Hinweis auf die entsprechenden Fälle der Tabelle IV in Tabelle V durchgeführt (die Numerierung in Tabelle IV geschah durch Numerierung der Querkolonnen [Impfung gleichen Datums!] mittels römischer Zahlen und gesonderte Numerierung der einzelnen Fälle dieser Kolonnen mittels lateinischer Buchstaben).

Aus dieser Einteilung nun geht hervor:

Gesamtzahl der Impfungen 77:		
Gleichbleiben des Kolonieentypus 41mal zu konstatieren;		
Vorwärtsentwicklung	30	" " "
Rückwärtsentwicklung	5	" " "
und zwar kommt vor:		
Gleichbleiben auf der Stufe	$\frac{H \text{ bzw. } HoS}{H}$	17mal (15 bzw. 2)
" " " "	$\frac{HmS}{HmS}$	5 "
" " " "	$\frac{R}{R}$	19 "
Vorwärtsentwicklung	$\frac{H \text{ bzw. } HoS}{HmS}$	13 " (10 bzw. 3)
über 1 Stufe: Typus	$\frac{HmS}{H+R}$	10 "
über 2 Stufen: Typus	$\frac{H \text{ bzw. } HoS}{H+R}$	7 " (2 bzw. 5)
Rückwärtsentwicklung	$\frac{HmS}{H}$	4 "
über 1 Stufe: Typus	$\frac{R}{H+R}$	1 "

Zu diesen Zahlen ist zu bemerken: Da im Anfang der Impfungen die Natur der Kolonien insofern nicht immer erschöpfend charakterisiert war, als öfters nur das Vorhandensein heller Kolonien verzeichnet ist, wo sicher oft Kolonien mit Sekundärkolonien sich gebildet hatten, so gehört ein Teil der Impfungen möglicherweise zu einer anderen Kategorie, als oben angegeben ist; und zwar kommt die Möglichkeit einer anderen Stellung in Betracht für höchstens 17 von den 41 Fällen der 1. Kategorie (Gleichbleiben des Kolonieentypus), für 10 von den 30 Fällen der 2. Kategorie (Vorwärtsentwicklung), für 4 von den 5 Fällen der 3. Kategorie (Rückwärtsentwicklung). Da nun die ganz unzweideutigen Fälle sich auf die 3 Kategorien im Verhältnis von 24:20:1 verteilen, kann man für die unsicheren Fälle die Rückwärtsentwicklung überhaupt außer acht lassen; sie wären demnach sämtlich auf die 1. und 2. Kategorie zu verteilen nach Maßgabe des Verhältnisses von 24:20; dabei kommt so ziemlich das ursprüngliche Verhältnis heraus, nämlich (wenn wir die 4 zweifelhaften Fälle der 3. Kategorie sämtlich der 1. zurechnen, wie es so gut wie sicher geschehen muß: Gleichbleiben 43 Fälle; Vorwärtsentwicklung 32 Fälle; Rückwärtsentwicklung 1 Fall.

Oder, wenn wir die 19 Fälle vom Typus $\frac{R}{R}$ aussondern: Gleichbleiben 24; Vorwärtsentwicklung 32; Rückwärtsentwicklung 1.

Massini hat für seinen Stamm außer den angeführten allgemeinsten Gesetzen folgende besondere festgestellt: Verimpft man eine weiße Kolonie nach 24-stündigem Wachstum, d. h., bevor es zur Knötchenbildung gekommen ist, so entstehen nur weiße Kolonien; verimpft man sie nach 4-tägigem Wachstum, d. h. nach Eintritt der Knötchenbildung, dann entstehen weiße und rote Kolonien; von diesen verhalten sich die weißen wie die Ausgangskolonie, die roten erzeugen nur mehr rote Kolonien. „Während im März 1906 die Abimpfung am 3. oder 4. Tage regelmäßig zu einem rotweißen Endo-Satz führte, konnte im Oktober 1905 ein Neuausstrich von Platten, welche am 5. Tage abgeimpft wurden (trotz Vorhandenseins von Knötchen [p. 36]), noch rein weiße Tochtersätze zur Folge haben, einmal sogar entstand noch bei Abimpfung am 8. Tage ein weißer Endo-Satz. Im allgemeinen ist es aber so, daß die mit Knötchen versehenen Kolonien bei Verimpfung rotweiße Endo-Sätze bilden“ (p. 32). „Statt eine junge 1-tägige Kolonie ohne Knötchen abzuimpfen, wird sehr sorgfältig vom Rande einer alten Kolonie abgestochen, ohne ein Knötchen mitzunehmen. Es gelingt so ebenfalls, nur weiße Sätze weiterzuzüchten. Wenn keine Knötchen mitverimpft

werden, tritt also keine Variation auf, wird andererseits möglichst nur von Knötchenmaterial zu einer neuen Aussaat genommen, so erhält man fast reinrote Platten“ (p. 37). „Auch die weißen Knötchen sind variierte Bakterien, nur wird hier das Freiwerden des Fuchsins durch einen von der übrigen Kolonie gebildeten Stoff verhindert“ (p. 37). „Es gelang nur ein einziges Mal, aus einer roten Kolonie wieder weiße zu erhalten“ (p. 38). „Die Rückzüchtung von Rot zu Weiß scheint nach einem anderen Modus zu erfolgen als die Bildung von Weiß zu rot. In letzterem Falle werden nur einige Bakterien in der weißen Kolonie rot, während im ersten Falle die ganze Platte von Rot zu Weiß umschlägt“.

Mit diesen wie den oben aufgeführten Ergebnissen Massinis stimmen die meinen fast vollständig überein.

Weißer Kolonien geben weiße mit oder ohne Knötchen oder weiße und rote Kolonien; letzteres freilich nicht nur, wie es nach längerer Züchtung von Massini beobachtet wurde, wenn die weißen Ausgangskolonien Knötchen enthielten, sondern auch, wie es Massini am Anfang seiner Beobachtungen begegnete, wenn Knötchen fehlten; doch ist der letztere Fall der seltenere, kam 5mal gegenüber 10 Fällen der ersten Art vor und gegenüber 5 Fällen, wo aus Kolonien mit Knötchen nur wieder solche mit Knötchen entstanden. Die Knötchen traten dabei in meinem Fall meist am 2. oder 3. Tage auf (vgl. in Tab. IV besonders Serie XV—XVII!), bei manchen Kolonien später (oder gar nicht?). Daß weiße und rote Knötchen von gleichem Werte sind, zeigt Impfung (a) und (b) von Serie XVIII.

Rote Kolonien brachten immer nur rote Kolonien hervor, mit einer einzigen Ausnahme (gegenüber 19 Fällen!) wie bei Massini, nur daß es sich bei dieser Ausnahme (Impfung (d) von Serie X) nicht um einen vollständigen, sondern einen partiellen Rückschlag handelte.

Daß es sich um dasselbe Bakterium wie bei Massini handelte, dürfte demnach sicher sein, obgleich ein weiteres Studium, wie es die Arbeit Massinis auszeichnet, in meinem Falle, wie gesagt, aus äußeren Gründen unterblieben ist.

Es erübrigt noch, auf eins aufmerksam zu machen. Es ist sehr wohl möglich, daß unter den oben besprochenen Stämmen A—H bzw. der größeren Zahl von Stämmen, aus denen A—H ausgewählt wurden, das „*Coli mutabile*“ mitenthalten war. Es könnte sich in der ursprünglichen „hellen“ Form in der Gruppe E mit den Charakteristiken des Enteritidis-Paratyphustypus befunden haben; der Stamm E selbst kommt freilich nicht in Betracht; ich habe wenigstens bei der Kontrollaussaat auf Endo Knötchen oder rote Kolonien nicht auftreten sehen. Die übrigen Stämme vom Typus E sind ausgeschaltet worden, bevor das „*Coli mutabile*“ entdeckt worden war. Es kann nun aber das „*Coli mutabile*“ in der mutierten „roten“ Form auch in der Gruppe A vom *Coli*-Typus vertreten gewesen sein, ja, es konnte A selbst ein solches mutiertes „*Coli mutabile*“ sein; die mutierte Form zeigt ja gegenüber gewöhnlichem *Coli* keinen kulturellen Unterschied; und eine Beobachtung Massinis zusammen mit einer eigenen könnte vielleicht der Vermutung als Stütze dienen. Massini hat nämlich mit einem *Coli mutabile*-Tierserum, das das *Coli mutabile* bis $\frac{1}{320}$ agglutinierte, Typhus (freilich auch Dysenterie Flexner) $\frac{1}{20}$ agglutiniert; das

Serum meines Patienten zeigte gegenüber Stamm A (freilich auch H = *Faecalis alcaligenes*) und Typhus ein ähnliches Verhältnis, A wurde ziemlich stark, Typhus schwach agglutiniert. Bestände die Vermutung zu Recht, so dürfte dem „*Coli mutabile*“ in meinem Falle wohl eine pathologische Bedeutung zugeschrieben werden, die im Falle Massinis gefehlt zu haben scheint.

Nachdruck verboten.

Beitrag zur experimentellen Biologie des z-Bacillus und seine Beziehungen zum Keuchhusten.

[Aus der Kgl. Universitäts-Kinderklinik zu Jassy (Rumänien)
(Direktor: Prof. Dr. M. Manicatide).]

Erste Mitteilung.

Von

Dr. Emil Savini,
Vol.-Assistenten der II. med. Uni-
versitätsklinik

und **Dr. Therese Savini-Castano,**
Vol.-Assistentin der Universitäts-
Kinderklinik

der Kgl. Charité zu Berlin.

Heutzutage umfaßt das wissenschaftlich vollkommene Studium irgend-eines pathogenen Mikroorganismus zwei Hauptteile: 1) Die Verhältnisse desselben zu den lebenden Geschöpfen, darunter sind Virulenz, Infektionswege und Pathogenität zu berücksichtigen und 2) sein Schicksal in der Außenwelt; beides kann aber nicht gründlich untersucht und verstanden werden, bevor man das Leben des betreffenden Mikroorganismus in den künstlichen Nährböden auf experimentellem Wege genügend kennen gelernt hat.

Nach Maßgabe der Fortschritte im Studium der Mikroorganismen im allgemeinen und besonders in dem der pathogenen hat sich die ganze medizinische Wissenschaft von Grund aus völlig verändert; nicht nur die pathologische Anatomie, die Pathologie und die Diagnostik konnten viele dunkle oder bisher irrige Probleme erklären, sondern auch die Prophylaxis, sowohl in der Medizin wie in der Chirurgie, hat für die Bekämpfung von Epidemien und vor allen Dingen in bezug der Verhütung von Infektionskrankheiten unermesslichen Nutzen gebracht. Nur die Therapie bietet bis jetzt eine sehr beschränkte Anzahl sicherer Behandlungsmethoden, welche aber, von ganz neuen Prinzipien ausgehend, bis jetzt unbekannte Wege in der Behandlung der Infektionskrankheiten eröffnet haben. Im übrigen dürfte ja im allgemeinen bekannt sein, wie langsam und minimal die Fortschritte auf diesem Gebiete vor sich gehen.

Wir kennen bis jetzt die Erreger vieler Infektionskrankheiten, jedoch bei anderen wieder ist derselbe entweder ganz und gar unbekannt, oder aber verschiedene Forscher behaupten, einen von ihnen gefundenen Mikroorganismus als den echten Erreger festgestellt zu haben, ohne dies aber genügend beweisen zu können. Ganz ähnlich verhält sich die Sache beim Keuchhusten, welcher zweifellos eine Infektionskrankheit darstellt. Es gibt kaum eine zweite Krankheit, bei welcher so zahlreiche Mikroorganismen als die echten Erreger angesprochen und noch mehr, zumeist

erfolglose, Behandlungsmethoden empfohlen worden sind, wie gerade beim Keuchhusten.

Ein Teil der Untersuchungen über die Aetiologie des Keuchhustens stammt aus denjenigen Frühstadien der Bakteriologie, wo der Forschersinn jeden neu entdeckten Mikroorganismus unbedingt als einen pathogenen Keim ansah, was aber bald zu einem vorübergehenden Mißtrauen gegen die Bakteriologie führte. Heute ist aber bewiesen, daß die große Mehrzahl der Mikroorganismen, welche überhaupt existieren, Saprophyten und nicht nur unschädlich, sondern sogar nützlich sind. Ja, wir wissen weiter noch, daß es verschiedene Klassen von Mikroorganismen gibt und von jeder Klasse nur eine oder wenige Species sich durch pathogene Eigenschaften auszeichnen, so z. B. der Diphtheriebacillus aus der Klasse der diphtherieähnlichen Bacillen, der Cholera-vibrio aus der Klasse der Vibrionen etc. Es ist aber auch bewiesen, daß man bisweilen allen Uebergängen von einer ganz unschädlichen saprophytischen Art zu einer streng pathogenen begegnet.

Die Zeiten, wo man fast die ganze bakteriologische Forschung mit Hilfe des Mikroskops und des Anlegens von Kulturen durchzuführen vermochte, sind schon längst vorbei; nach Maßgabe der allmählich gemachten Fortschritte in der Bakterienkunde wurde ihre Biologie näher und genauer erkannt, und so gewann man die Ueberzeugung, daß es keine leichte Sache ist, wie bisher angenommen wurde, irgendeine Bakterienart nur nach dem mikroskopischen Aussehen und ihren Wachstumscharakteren auf verschiedenen Nährböden sicher und einwandfrei festzustellen. Auch andere biologische Eigenschaften, sowie das Tierexperiment selbst, sind oft nicht imstande, eine richtige Entscheidung herbeizuführen. Dann kam die Entdeckung der wichtigen, sogenannten biologischen differentialdiagnostischen Methoden, welche durch ihre Einfachheit, Sicherheit und Schnelligkeit in der Ausführung bald und mit Recht die Oberhand gewannen. Den älteren Methoden, wie mikroskopische Form, Wachstumscharaktere auf verschiedenen Nährböden, pathologisch-anatomische Befunde, Tierversuche etc., blieb eine bescheidenere Stelle übrig, trotzdem können auch diese zur Differentialdiagnose beitragen, beanspruchen aber Erfahrung, verhältnismäßig viel Zeit und können nicht bei allen Mikroorganismen, aus leicht zu ersiehenden Gründen, Anwendung finden. Heute verfügen wir über recht zahlreiche Methoden, um eine sichere Diagnose irgendeines Mikroorganismus und seiner Stoffwechselprodukte aufstellen zu können. Trotzdem möchten wir mit Bestimmtheit im allgemeinen den Satz gelten lassen: Es gibt kaum ein einziges Merkmal, welches für die sichere Artbestimmung irgendeines gegebenen Mikroorganismus pathognomonisch ist, und daß vielmehr nur das Zusammensein möglichst vieler Charaktere die Frage zufriedenstellend lösen kann. Uns scheint, daß eben diese Prämisse bei der Aetiologiefrage des Keuchhustens am meisten zu berücksichtigen ist, da eben hier nicht nur einmal angenommen worden ist, daß verschiedene, aber ziemlich nahestehende Bakterien von manchen Autoren für identisch angesehen sind und umgekehrt, manche wieder als neu entdeckt betrachtete Bakterien als identisch mit anderen, schon lange beschriebenen sich herausstellten.

Wir wollen uns hier nicht mit den Resultaten anderer Autoren befassen, welche aus ihren bezüglichen Arbeiten bekannt sind, sondern gehen zum Studium des z-Bacillus selbst über. Dieser, zum ersten

Male von Manicatide isolierte und kultivierte Bacillus, sollte seiner Meinung nach als Erreger des Keuchhustens gelten. Als seine Schüler waren wir lange Zeit Zeugen seines wissenschaftlichen und unermüdlichen Strebens, besonders was die Serotherapie dieser Krankheit betrifft, sahen die schönen Resultate, die sich durch eine konsequente Durchführung der Behandlung erzielen ließen, und traten an das Werk ohne jede vorgefaßte Meinung, um die sogenannte experimentelle Biologie des z-Bacillus zu studieren, was bisher noch nicht unternommen war. Wir bezweckten dadurch, die Gesamtcharakteristik dieses neu entdeckten Bacillus aufzuklären und ihm eine selbständige Stelle zu sichern. Wir glauben diesen Zweck, wenn auch nicht ganz, wenigstens zum größten Teil erreicht zu haben. Außer der experimentellen Biologie sind hier noch andere Fragen berührt oder behandelt worden.

Bevor wir zum eigentlichen Thema dieser Arbeit übergehen, möchten wir einige Worte über die Einteilung des Materials sagen. In den meisten bakteriologischen Büchern, sogar in den hervorragendsten, findet man bei der Beschreibung jedes Mikroorganismus die Morphologie und die Biologie desselben als zwei verschiedene, ja sogar als gegenüberstehende Dinge, dem wir aber durchaus nicht beipflichten können. Vielleicht ist es praktisch, unter dem Worte Biologie die Physiologie zu verstehen: diese Einteilung bleibt aber immerhin unwissenschaftlich, solange wir wissen, daß die Biologie uns über die lebenden Wesen belehrt, und das aus zwei Gesichtspunkten: 1) statisch (wo die Morphologie einzureihen ist) und 2) dynamisch (wohin die Physiologie gehört). Mit anderen Worten: Die Morphologie ist ein Teil der Biologie und keineswegs etwas Verschiedenes. Deswegen haben wir Abstand davon genommen, eine derartige Einteilung vorzunehmen.

Form des z-Bacillus.

Bei seinen ersten einschlägigen Untersuchungen über die Aetiologie des Keuchhustens hat Manicatide im Jahre 1895 den z-Bacillus in der Universitäts-Kinderklinik des Prof. Grancher in Paris entdeckt, dann seine Studien darüber in der Heubnerschen Universitäts-Kinderklinik in Berlin zum größten Teil vervollständigt und schließlich in seiner eigenen Universitäts-Kinderklinik, besonders bezüglich der Serotherapie, fortgesetzt.

Bei der mikroskopischen Untersuchung, sowohl in lebendem wie in fixiertem und gefärbtem Zustande, erweist sich die gewöhnliche typische Form des z-Bacillus als die eines kleinen ovalen Coccobacillus, welcher ziemlich ähnlich dem Influenzabacillus ist, wenn auch bedeutend größer: die Refrangibilität des Bacillenleibes im lebenden, wie auch seine Färbbarkeit im fixierten Zustande, ist eine gleichmäßige in seiner ganzen Ausdehnung. Trotzdem ist der z-Bacillus, wie wir weiter sehen werden, nicht in die Gruppe der influenzaähnlichen Bacillen anzureihen.

An seinen beiden Polen ist er nach außen leicht konvex abgerundet, doch ist der eine etwas spitzer als der andere, sein Umriß ist aber überall glatt. Diese konvexe Abrundung beschränkt sich nicht nur auf die Polflächen, sondern setzt sich auch auf die Seitenflächen fort, es kommt noch hinzu, daß letztere nicht völlig parallel laufen, vielmehr sich dem spitzen Ende nähern. Hieraus resultiert eine eiförmige Gestalt, welche derjenigen der elliptischen Streptokokken sehr ähnlich ist.

Wenn wir die K r u s e sche Anschauung über die Bakteriengrundformen

hier anwenden wollen, so wäre danach der z-Bacillus im morphologischen Sinne (Kugel, Stäbchen, Schraube) ein Stäbchen und im generischen Sinne (Coccus, Bacillus, Spirillum) ein Bacillus. Wir können die Sache noch genauer präzisieren, wenn wir die Gruppe der ovalen Bakterien als eine Uebergangsgattung zwischen dem Coccus und dem Bacillus betrachten und mit dem Namen Coccobacillus oder Bakterium bezeichnen. Der z-Bacillus mit seiner konstanten typischen plumpen eiförmigen Gestalt wäre eben ein Exemplar dieser Gattung, deswegen möchten wir der Strenge der Nomenklatur wegen die Bezeichnung für ihn als Coccobacillus oder Bakterium vorziehen.

Die Erfahrung hat uns noch gelehrt, daß der z-Bacillus konstanterweise, solange er sich unter normalen Wachstums- und Ernährungsbedingungen befindet, seine typische Form hartnäckig und streng bewahrt, sobald er aber eine veränderte Form zeigt (größer, länger und dünner, Keulenbildung etc.), so ist dies schon ein Zeichen von meist ungünstigen Wachstumsbedingungen (Glyzerinzusatz, Ueberschuß an Kochsalz, erschöpftes oder zu altes Nährmedium, Vorhandensein von Hemmungssubstanzen etc.), aber durchaus nicht immer ungünstig. In solchen Fällen läuft Wachstum und Teilungsenergie der einzelnen Individuen nicht mehr parallel, so z. B. auf Glyzerinnährböden (Glyzerin wirkt hemmend auf die Entwicklung des z-Bacillus) wächst er langsam zu kleinen durchsichtigen Kolonien, während die einzelnen Individuen länger sind als auf gewöhnlichen Nährböden; auf erschöpften Nährmedien ist das Wachstum der Kolonien ebenfalls ein schwieriges, doch sind die Bacillen länger, auch kommen zahlreiche Involutionsformen vor etc. Trotzdem möchten wir schon jetzt betonen, daß die Neigung zur Involutionsformenbildung, welche z. B. beim Czaplewski-Henselschen Bacillus eine so große ist, beim z-Bacillus nur eine ziemlich geringe Rolle spielt (über die atypischen und Involutionsformen des z-Bacillus s. w. u.).

Größe und Größenverhältnisse.

Die Hauptrolle hierbei spielen die Natur und die Eigenschaften des Nährsubstrates, auch das Alter der Kultur ist von gewisser Bedeutung. Demgemäß ist der z-Bacillus auf verschiedenen Nährmedien nicht gleich groß, so ist er z. B. auf Serumnährmedien (Loeffler-Serum, koaguliertem Menschenserum) am größten, auf Kartoffeln ebenfalls groß, auf koaguliertem Eiweiß im Gegenteil klein und fast ganz rund, einem Coccus sehr ähnlich, in Milch ebenfalls klein etc. In ein und derselben jungen Kultur sind die Bacillen gewöhnlich ziemlich gleichmäßig, aber streng genommen nicht ganz groß; die Differenzen sind aber sehr gering.

Durch unzählige Messungen haben wir wiederholt die Größe des z-Bacillus aus Sputum und verschiedenen Kulturen (immer 24-stündige Kulturen bei 38° C) auf verschiedenen Nährböden, in 0,85-proz. NaCl-Lösung, Peptonwasser, Bouillon und Blutserum in lebendem Zustande, sowie bei fixierten und gefärbten Präparaten an vielen Individuen auf das genaueste bestimmt. Alle diese Messungen sind mit Hilfe des Okularschraubenmikrometers ausgeführt worden und nämlich bei Präparaten, welche nicht in Kanadabalsam, sondern in physiologischer Kochsalzlösung eingeschlossen waren, damit die Größe der Bacillen möglichst nahe der wahren bleibt; beim Photographieren haben wir ebenfalls so verfahren.

Es sei hier die durchschnittliche Größe des Influenzabacillus zum Vergleich angeführt: $0,5 \times 0,2 - 0,3 \mu$; wie aus den nachfolgenden Zahlen

zu ersehen ist, ist der z-Bacillus bedeutend größer als der erstere, und zwar in:

Sputum	0,8 — 1,0	×	0,6 — 0,7	μ
Bouillon	0,77 — 0,91	×	0,49 — 0,56	„
Agar	0,98 — 1,33	×	0,7 — 0,91	„
Loeffler serum	0,77 — 0,98	×	0,63 — 0,79	„
Kartoffel	1,12 — 1,19	×	0,66 — 0,7	„
koagulierte Eiweiß	0,84 — 0,91	×	0,63 — 0,7	„

Beweglichkeit.

Der z-Bacillus besitzt eine Eigenbewegung weder bei Zimmertemperatur noch bei 38° C; wird er im hängenden Tropfen in verschiedenen Nährflüssigkeiten lebendig beobachtet, so hat er zwar eine sehr lebhafte Molekularbewegung, die durch Wärme noch mehr gesteigert wird, aber auch durch Hinzufügen eines Antiseptikums nicht zum Stillstand kommt. Wir wollen noch bemerken, daß alle Färbungsverfahren, die wir zur Darstellung der Geißeln angewandt haben, versagten, was mit dem Mangel an Eigenbewegung gut übereinstimmt.

Gruppierung.

Neben der Form ist die gegenseitige Lage der Bacillen beim z-Bacillus höchst charakteristisch. Nach der Teilung, sei es in flüssigen oder auf festen Nährsubstraten, lösen sich die neu entstandenen Bacillen nicht in einzelne, frei herumliegende auf, sondern ordnen sich eigentümlicherweise in palissadenförmiger Lage, je mehrere parallel dicht aneinander, ungefähr wie dies beim Diphtheriebacillus der Fall ist, zu Kettenverbänden zusammen. Der Umstand, daß das Schütteln oder die ziemlich starken Flüssigkeitserschütterungen, welche bei der mikroskopischen Untersuchung in lebendem Zustande im hängenden Tropfen entstehen, nicht imstande sind, die Bacillen aus ihrer gegenseitigen Lagerung zu reißen, führt zu der Annahme, daß die Bacillen durch irgendeine klebrige Masse verbunden gehalten werden, wie bei einer spontanen Agglutination.

Jeder einzelne Kettenverband besteht gewöhnlich aus 3—8 oder auch noch mehreren, parallel zueinander gelagerten Bacillen, deren Längsachse senkrecht auf der Kettenachse liegt. Sehr selten trifft man gerade Kettenverbände, am häufigsten sind dieselben, ungefähr wie bei Streptokokken, gebogen, wellenförmig.

Aus dem Umstand, daß die Pole des z-Bacillus ungleich dick sind, könnte man a priori sehr geneigt sein zu glauben, daß in einer gebogenen Bacillenkette alle Individuen ihre dicken Enden stets nach der Konvexseite der Kette gelegen haben sollten. Das ist aber durchaus nicht konstant; sehr oft findet man Kettenverbände, in welchen alle Bacillen mit ihrem dicken Pol nach der Konkavseite zu liegen, so daß die spitzen Enden nach der Konvexseite gerichtet auseinanderlaufen: ab und zu, jedoch seltener, kommen Kettenverbände vor, wo die einzelnen Bacillen verschiedene Stellungen einnehmen, die einen mit dem dicken, die anderen mit dem spitzen Ende nach der Konvexseite zu gelegen sind.

Ebenso häufig und charakteristisch, eigentümlich sogar, ist die Anordnung der Bacillen je zwei aneinander, und zwar derart, daß sie stumpfwinkelig oder wie ein Zirkumflexakzent beisammenliegen. Die Anordnung mit je zwei parallel gelagerten ist seltener.

Eine Ausnahme bietet die Anordnung der Bacillen zu je zweien hintereinander liegend, und zwar haben wir bis jetzt noch nie eine solche

Gruppe aus mehr als zwei Bacillen bestehend gesehen. Auftreten von vereinzelter Bacillen oder von unregelmäßig kleineren oder größeren Haufen gehört ebenfalls zu den Seltenheiten.

Das oben Gesagte bezieht sich lediglich auf die Struktur der Gebilde, welche in den frischen oder gefärbten mikroskopischen Präparaten vorkommen. Um eine Vorstellung über die Architektonik der Kolonien zu gewinnen, bedarf man der Klatschpräparate. Wir haben solche von ganz jungen Gelatine- und 12-stündigen bei 38° C gehaltenen Agarplattenkulturen angefertigt, fixiert und gefärbt. Bei der Betrachtung eines solchen Präparates mit schwächerer Vergrößerung erscheint die Bacillennasse in Vielecken, meistens Dreiecke und Rauten, welche sich an ihren Ecken untereinander vielfach anastomosieren und runde, ovale oder vieleckige leere Zwischenräume bilden, wie solches beim *Staphylococcus* fast ähnlich ist. Untersucht man aber die Struktur der einzelnen Vielecke mit Hilfe der homogenen Immersionslinse, so sehen wir bald, daß dieselben aus einer Unmasse von Coccobacillen besteht, deren Längsachse im allgemeinen parallel der größten Dimension des Vielecks verläuft; untereinander werden sie von langen schmalen Zwischenräumen mit derselben Richtung von senkrechten noch schmälern durchschnitten. In den Anastomosen nehmen die Bacillen ebenfalls eine Längsrichtung, nur sehr selten eine transversale Lage an.

Im Sputum von Keuchhustenkranken findet sich der z-Bacillus im allgemeinen vereinzelt, unregelmäßig verteilt, meist außerhalb der Leukocyten. Zuweilen findet er sich in so wenigen Exemplaren, daß das Sputum bei oberflächlicher Untersuchung steril zu sein scheint; mitunter wieder aber tritt er so zahlreich auf, daß er im ganzen mikroskopischen Felde zu finden ist, vereinzelt oder kleine oder größere Häufchen bildend inner- oder außerhalb der Leukocyten. Fast immer läßt er sich in Gemeinschaft mit anderen Bakterien nachweisen, speziell mit Streptokokken. Wenn er so zahlreich vorhanden ist, dann kann es ausnahmsweise vorkommen, ab und zu dieselbe Gruppierungsweise wie in Kulturen zu finden, aber das stellt, wie gesagt, eine große Seltenheit dar.

Nicht bloß für den Unerfahrenen, sondern auch für den etwas Geübteren ist es zuweilen nicht leicht, ohne weiteres den z-Bacillus mit Bestimmtheit zu erkennen. Da eine Verwechselung mit verschiedenen anderen Bakterien verhältnismäßig leicht vorkommen kann, so wollen wir hier durch ein paar Worte auf einige der Fehlerquellen hinweisen.

Was das Wachstum auf verschiedenen Nährböden anbetrifft, so bietet der z-Bacillus, wie wir später sehen werden, keine auffällige Besonderheiten, und mikroskopisch ist er wegen seiner eigentümlichen Form einem Coccus sehr ähnlich; deswegen liegt die Gefahr nahe, ihn meistens mit Kokken oder Coccobacillen zu verwechseln. Hier kommen speziell in Betracht: *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Micrococcus catarrhalis*, Czaplewski-Henselscher Bacillus, und zwar kann es vorkommen, entweder daß einer dieser Bakterien für den z-Bacillus angesehen wird oder, trotzdem man denselben unter dem Auge hat, man hält ihn für einen der obengenannten Mikroorganismen; am häufigsten wird der z-Bacillus verkannt.

Es gibt Streptokokkenarten, bei welchen die Kettenverbände kurz sind und aus nicht ganz runden, sondern in der Querrichtung abgeplatteten, ovoiden, mit ihrer Längsachse senkrecht auf die des Ketten-

verbandes liegenden Kokken bestehen; daraus sieht man schon, wie sehr dem z-Bacillus ein solcher Streptococcus ähnlich ist.

Wenn das mikroskopische Präparat des z-Bacillus nicht sorgfältig genug angefertigt wird, d. h. wenn das Material nicht gut ausgebreitet ist, dann bleibt die Bacillenmasse in isolierten Haufen liegen und dadurch wird die charakteristische Gruppierung verdeckt, und so kommt leicht eine Verwechselung mit einem Staphylococcus oder sogar Micrococcus catarrhalis vor. Das geübtere Auge findet aber bei genauer Untersuchung auch in solchen Haufen die charakteristische Kettenanordnung der Bacillen ohne Schwierigkeit heraus.

Kommt noch hinzu, daß eine ungeeignete Färbung (Methylenblau) angewandt wird, daß man den z-Bacillus auf einem Nährboden züchtet, wo seine Form nicht charakteristisch hervortritt, sondern der der Kokken sehr ähnlich ist, so gerät man noch leichter in Zweifel. Trotzdem wollen wir hier ausdrücklich betonen, daß diese Verwechselung nur bei flüchtiger, ungenauer Untersuchung eintreten kann. Man würde immer gut tun, die charakteristische Form des z-Bacillus mit Karbolfuchsinfärbung aus einer Kultur auf Nährmedien, wo seine Form typisch ist, zu prüfen; die kokkenartige Form kommt nur auf geronnenem Eiweiß und in Milch vor, jedoch wird von diesen nur ausnahmsweise Gebrauch gemacht.

Im Anfang ist es schwer, jemand zu überzeugen, daß der z-Bacillus wirklich ein Bacillus ist und kein Coccus; trotzdem ist und bleibt er ein Bacillus, da er diese Form konstant aufweist.

Aus manchem Grunde vermuten wir auch, ganz wie Manicatide, daß verschiedene Autoren den z-Bacillus oft unter dem Auge gehabt, ihn aber für den Czaplewski-Henselschen oder vielleicht einen anderen gehalten haben.

Osmotische Verhältnisse.

Verweilt der z-Bacillus einige Zeit in der Lösung einer Substanz, welche weder durch ihre Natur noch durch die Konzentration für ihn schädlich ist, so gleicht der osmotische Innendruck des Bacillus demjenigen der Lösung, dem osmotischen Außendruck und, wenn auch nachher ganz allmähliche Konzentrationsänderungen der Lösung statthaben, so bleibt für das osmotische Gleichgewicht genügend Zeit, sich wiederherzustellen, ohne daß hierbei irgendeine morphologische Aenderung im z-Bacillus zu beobachten ist.

Findet dagegen die Konzentrationsänderung plötzlich statt, dann wird dadurch sofort das osmotische Gleichgewicht gebrochen und gibt sich durch eintretende morphologische Veränderungen im Zellleib des z-Bacillus kund, welche aber verschieden sind, je nachdem die zweite Lösung mehr oder weniger konzentriert ist als die erste. Beim z-Bacillus sind wegen seiner Kleinheit diese morphologischen Vorgänge, Plasmolyse und Plasmoptyse, ziemlich schwer festzustellen, wir haben sie aber sicher beobachtet und studiert. Die Bakterienzellen der älteren Kulturen lassen die Phänomene viel leichter und deutlicher erkennen als die jüngeren.

Wir haben Versuche meist mit Kochsalz-, Zucker- und Glycerinlösungen verschiedener Konzentrationen angestellt und folgende Resultate dabei bekommen.

Wird der z-Bacillus etwas plötzlich in eine konzentriertere Lösung übertragen, z. B. aus einer 2-proz., wo er längere Zeit verweilte, in eine 10-proz. Kochsalzlösung, so entstehen dabei die bekannten plasmoly-

lytischen Phänomene, indem unter starker Verlangsamung der Molekularbewegung und sogar ihrer vollständigen Sistierung nach kurzer Zeit die unbeweglichen, in der Mitte dunklen (wenig refrangiblen) Bacillen an beiden Polenden je ein helles, etwas refrangibles Körnchen aufweisen; durch die Kontraktion des Plasmas hat sich dasselbe zu zwei verdichteten, stark lichtbrechenden Körperchen geteilt und an die Polenden zurückgezogen.

Ein dauerhaftes Präparat läßt sich leicht herstellen, indem ein Tropfen auf ein Deckglas gut ausgebreitet und schnell ausgetrocknet, hierauf fixiert und gefärbt wird. Die Färbung solcher Präparate erfordert längere Zeit als gewöhnlich: etwa eine halbe Stunde mit $\frac{1}{20}$ — $\frac{1}{25}$ verdünnter Karbolfuchsinlösung. Man sieht hier sehr gut, wie einzelne Bacillen an beiden Enden intensiv gefärbt sind (Polarkugeln), in der Mitte jedoch blaß bleiben, einigemal machen sich auch an den Längsseiten intensiv gefärbte kleine Protoplasmae Reste bemerkbar.

Werden aber diese Erscheinungen längere Zeit hindurch beobachtet, so kann man sich überzeugen, daß die morphologischen Veränderungen an den Bacillen allmählich zurücktreten, um schließlich zu verschwinden; die Polarkügelchen beginnen abzublassen und die Mitte weniger dunkel zu erscheinen, bis der Bacillus endlich wieder in seiner ganzen Ausdehnung gleichmäßig lichtbrechend wird. Gleichzeitig mit diesen retrograden Veränderungen kehrt auch die Molekularbewegung langsam zurück, bis von den sich abgespielten Veränderungen gar nichts mehr wahrzunehmen ist.

Diese Veränderungen verlaufen also, ohne daß das Leben der Bacillen gefährdet wird, eine Wiederherstellung ist sehr leicht möglich und das osmotische Gleichgewicht stellt sich von selbst wieder her.

Dieser experimentellen Plasmolyse steht aber eine natürliche gegenüber, welche bei einigen Bakterienarten, wie z. B. bei den Pest-, Hühnercholera-, Tuberkel-, Lepra-, Diphtheriebacillen, spontan erscheint und sogar so regelmäßig, daß sie auch als differentialdiagnostisches Mittel gegenüber ähnlichen Bakterien zu verwerten ist. Es erscheinen nämlich die genannten Bakterien unter den gewöhnlichen Bedingungen mit Chromatinstreifen und farblosen Lücken abwechselnd versehen, wo dieselben sich zu entwickeln brauchen, sei es im tierischen Körper, sei es in Kulturen. Inwieweit die experimentelle und die spontane Plasmolyse als verschieden angesehen werden sollen, kann man schwer sagen, zumal wir auch beim z-Bacillus, wenn auch nur höchst selten, das Auftreten solcher spontanen Plasmolyse beobachten konnten. Darüber soll weiter unten, bei den besonderen Wuchsformen desselben, gesprochen werden.

Wird nun der experimentelle Versuch mit dem z-Bacillus in umgekehrter Weise vorgenommen, nämlich aus einer konzentrierten (10-proz.), wo er längere Zeit verweilt hat, in eine dünnere (2-proz.) Kochsalzlösung plötzlich übertragen, so spielt sich das bekannte plasmoptysische Phänomen ab, welches eingehend bei vielen Bakterienarten von Fischer bereits studiert worden ist. Wie wir uns wiederholt überzeugen konnten, bleibt die Mehrheit der Bacillen unversehrt, nur ein gewisser Teil derselben büßt ihre Molekularbewegung ein, fangen an sich aufzublähen und weniger lichtbrechend zu werden, worauf an einem der beiden Pole des Bacillus ein Kügelchen sichtbar wird, welches sich anfangs dem Bacillus anlehnt und glänzend erscheint, danach aber durch Quellung immer größer, schwächer lichtbrechend und undeutlicher begrenzt wird; es liegt

das Gebilde eines köpfchentragenden Bacillus vor. Diese Kugeln treten immer nur an einem der beiden Polenden des Bacillus auf. Nach einiger Zeit löst sich die Kugel vom Bacillus ab und schwimmt frei herum, wobei eine schwache Molekularbewegung bei ihr zu konstatieren ist. Die Kugel vergrößert sich immer mehr, wird zunehmend blasser und schwieriger zu beobachten und löst sich schließlich ganz auf. Mit dem Bacillenrest, wovon die Kugel ausgegangen ist, geschieht dasselbe, nur viel langsamer.

Daraus ist leicht zu ersehen, wie schwer, ja sogar tödlich eine solche Veränderung verläuft.

Auch in dem Falle wird das Studium des Phänomens sehr gut durch das gefärbte Präparat ergänzt, und man findet, daß unter gleichmäßig gefärbten Bacillen einige sind, welche den Farbstoff nur sehr schwach angenommen haben, und wieder andere, die an einem Polende eine große blaßgefärbte Kugel besitzen, solche Kugeln sind aber auch frei anzutreffen; man findet jedoch solche freie Gebilde, welche nicht kugelig geformt sind, sondern auch oval, kegel- und sogar spindelförmig, die meisten sind aber kreisförmig.

Merkwürdig ist, wenn es auch nicht häufig vorkommt, das Auftreten der Plasmolyse bei einzelnen Individuen unter Bedingungen, wo sonst nur die Plasmoptyse auftreten sollte; diese Tatsache hat bis jetzt noch keine genügende Erklärung gefunden. Auch beim z-Bacillus haben wir dieses beobachtet, sowohl im frischen wie im gefärbten Präparat.

Involutions- und besondere atypische Wuchsformen.

Der typischen kokkobacillären Form des z-Bacillus, welche mit großer Regelmäßigkeit im tierischen Organismus sowie in allen Kulturen desselben immer und immer wieder erscheint, sind eine Reihe atypischer Wuchsformen gegenüberzustellen, welche ab und zu vorkommen. Diese Involutions- und besonderen Wuchsformen, wenn auch bei beiden dieselben Gebilde vorhanden sein können, sind aber scharf voneinander zu trennen und zu deuten, wie wir gleich sehen werden. Das Atypische in der Wuchsform betrifft einerseits die eigentlichen Form- und Größenverhältnisse des z-Bacillus, andererseits aber auch die innere Struktur des Zelleibes selbst.

Was zunächst die Form anbelangt, so ist darüber folgendes zu sagen: Die Polenden der Stäbchen, welche für gewöhnlich abgerundet sind, erscheinen manchmal kolbig aufgetrieben oder spitz auslaufend; die Seitenkonturen erfahren verschiedene, zum Teil unregelmäßige Abweichungen, wodurch verschiedenartige, wie Hantel-, Keulen- und noch andere Wuchsformen entstehen, ziemlich ähnlich denen, welche beim Diphtheriebacillus so oft vorkommen. Die Größe dieser atypischen Gebilde ist meistens bedeutend umfangreicher als die der typischen Formen, zuweilen aber auch bedeutend kleiner. Von der Struktur ist zu bemerken, daß dieselbe entweder gleichmäßig wie beim ursprünglichen Typus bleibt, was aber nur selten der Fall ist, oder diese atypischen Gebilde weisen sowohl im frischen wie im gefärbten Präparate eine mehr oder weniger regelmäßige Streifung auf.

Um im gegebenen Falle entscheiden zu können, ob wir es mit einer Involutions- oder mit einer besonderen Wuchsform zu tun haben, dafür ist nicht die Form des Gebildes an und für sich, sondern die Bedingungen, unter welchen dieselbe zum Vorschein gekommen sind, maßgebend.

Hierfür wollen wir ein interessantes Beispiel anführen. Einmal geschah folgendes: aus einer Reinkultur des z-Bacillus, welche schon x Male auf Agar und Bouillon umgezüchtet worden war, wurde eine größere Menge Bouillon (ca. $\frac{1}{3}$ l) in einem Kolben besät, um eine größere Menge Kulturmateriale zu Immunsierungszwecken bekommen zu können. Die Kultur blieb, wie gewöhnlich für diese Zwecke, 5 Tage lang im Thermostaten bei 38° C. Dazu haben wir nur zu bemerken, daß das Pepton (es wurde immer das Pepton Witte zur Bereitung der Nährböden benutzt), mit welchem die letzten Agarröhrchen bereitet wurden, ziemlich alt war und sogar die letzten Reste einer Flasche; morphologisch und in ihrer Entwicklung zeigten aber die z-Bacillen gar keine nennenswerten Abweichungen. Das Pepton (auch Wittesches), mit welchem die neue Bouillon hergestellt wurde, war ganz frisch und von sehr guter Qualität. Nun wurde die große Bouillonkultur nach 5 Tagen der mikroskopischen Kontrolle vor der Immunsierung unterzogen; für gewöhnlich findet man in einer solchen Kultur nur tadellos erhaltene typische Formen. Die Kultur war zwar üppig gediehen, aber zur großen Ueberraschung zeigten die meisten Bacillen ungewöhnliche, stark veränderte Formen, welche sehr ähnlich der Form eines mittleren Diphtheriebacillus waren, sowohl in Dimensionen, Form und Gruppierung, wie auch in transversaler Streifung und Färbbarkeit; es fanden sich da auch, wie beim Diphtheriebacillus, ähnliche Keulen- und Hantelformen, daneben aber doch noch viele mit der typischen Form, Größe und Gruppierung des z-Bacillus. Im frischen Präparat erschienen die meisten dieser langen Bacillen wie eine glänzende Perlenreihe, durch enge dunkle, transversale Streifen getrennt, andere dagegen hatten nur an ihren beiden Polen je ein helles Körnchen; auch die kolbigen Formen zeigten eine transversale Streifung, sehr ähnlich wie beim Diphtheriebacillus. Im gefärbten Präparate waren einige an den Polen kräftig gefärbt und in der Mitte blasser, andere gestreift wie der Diphtheriebacillus, und auch mit derselben Gruppierung.

Da die Impfung streng korrekt aus einer Reinkultur vorgenommen wurde und die nachträglichen Uebertragungen auf verschiedene Nährböden nur typische z-Bacillen aufwiesen, so ist eine Verunreinigung bei der Impfung mit einem Diphtherie- oder diphtherieähnlichen Bacillus ganz und gar ausgeschlossen.

Echte Verzweigungen sind beim z-Bacillus, wenigstens bis heute, noch niemals beobachtet worden, ähnliche Bilder aber oft.

Dem Auftreten solcher eigenartigen Wachstumsgebilde bei einem sonst gut charakterisierten Bacillus können wir noch folgende beim Diphtheriebacillus von uns oft beobachtete Tatsache anführen: Wird bei der Impfung aus der diphtherischen Pseudomembran ein altes und etwas abgetrocknetes Loeffler-Serum benutzt, so bekommt man nur kleine, winzige, aus kurzen ovalen Bacillen bestehende Kolonien; werden aber dieselben auf frisches und gutes Loeffler-Serum nachher überimpft, so entwickeln sich schön ausgebildete, aus langen, gut charakterisierten Diphtheriebacillen bestehende Kolonien, darunter zahlreiche besondere Wuchsformen (Keulen-, Hantelgebilde); diese Kulturen sind für Tiere sehr virulent.

Wir ersehen daraus, daß das Auftreten solcher atypischen Formen unter so ausgezeichneten Lebensbedingungen keinesfalls etwa als degenerative Produkte anzusehen sein dürften; im Gegenteil, durch bessere Ernährungsverhältnisse wachsen die vorher verhungerten Bakterien durch

gierige Nahrungsaufnahme zu riesenhaften Formen; die Wachstumskraft einzelner Individuen ist erhöht, es entstehen hypertrophische Formen, welche frühzeitig erscheinen und, wie wir gesehen haben, starke Tierpathogenität besitzen.

Was nun das Auftreten der Involutionsformen beim z-Bacillus anbetrifft, so sind dieselben vielfach zu beobachten, und zwar unter sehr verschiedenen Bedingungen, mit stets ungünstigem Einfluß auf das Gedeihen desselben; daher sind solche Formen wohl als Degenerationsprodukte anzusprechen. Derartige Wuchsformen erscheinen in alten Kulturen, bei Zusatz gewisser Substanzen zu denselben (starker Zusatz von Kochsalz etc.) als viel zu große oder viel zu kleine Bacillen, nehmen eine bacilläre, besser charakterisierte Form an, es bilden sich Keulen-, Hantelformen, Bacillenschatten etc. Im lebenden Organismus sind solche Formen noch niemals beobachtet worden. Die genauere Beschreibung aller dieser Involutionsformen ist im einzelnen weiter unten erörtert, wo von denselben die Rede ist.

Die besonderen und die Involutionsformen haben eine gewisse Bedeutung für die Verwandtschaftsverhältnisse des z-Bacillus, wie wir weiter sehen werden.

Färbbarkeit und mikrochemische Reaktionen des z-Bacillus.

Seiner Natur nach gehört der z-Bacillus denjenigen Bakterien an, welche leicht färbbar, aber auch verhältnismäßig leicht entfärbbar sind. In trockenen und durch Flamme oder Alkohol fixierten Präparaten nimmt er alle basischen Anilinfarbstoffe schon nach wenigen Sekunden gut und schnell an, bei einer $\frac{1}{2}$ bis höchstens 1 Minute Färbungsdauer lassen sich sehr gute Präparate erzielen. In der Regel färben sich alle Individuen gut und gleichmäßig (Sputum oder junge Kulturen), nur sehr selten begegnet man einer Polarfärbung, jedoch ist dieselbe nur bei in Spaltung begriffenen Bacillen zu finden. Auch eine kurze Vorbehandlung der Präparate mit 0,5—1-proz. Essigsäure und nachträgliche, vorsichtige schwache Färbung gestattet keine Polarfärbung, welche dagegen beim Czaplowski-Henselschen Bacillus typisch sein sollte. In Präparaten aus älteren Kulturen ist aber oft eine Ungleichmäßigkeit in der Färbung zu konstatieren, es finden sich auch Bacillenschatten vor, d. h. Bacillen, bei welchen nur die periphere Zone gefärbt ist, die Mitte dagegen bleibt ganz farblos.

Bei der Färbung mit blauen Anilinfarbstoffen (Methylenblau, Loeffler-Kühne-Methylenblau, Polychromblau nach Unna, Methylblau) sieht der z-Bacillus mit etwas undeutlichen Rändern kleiner und feiner aus, als bei Färbung mit roten oder violetten (Fuchsin, Karbolfuchsin, Gentiana-, Kristall-, Methylviolett). Wir glauben aber nicht, daß das auf eine Quellung des Bakteriumplasmas durch die letzteren Farblösungen zurückzuführen ist, sondern sind vielmehr der Ansicht, daß die blauen Farbstoffe nur das zentrale Plasma der Bakterienzelle zu färben imstande sind (Entoplasma), während dagegen die roten und violetten die Eigenschaft besitzen, auch das äußere Plasma (Ektoplasma) zu tingieren. Mit Boraxmethylenblau und Karbolfuchsin, entweder nacheinander oder in einem geeigneten Gemische angewandt, konnten wir die Bacillen in demselben Präparat derart darstellen, daß die Mitte immer blau und die Peripherie sich als eine rote, rings herum gelagerte Schicht färben ließ.

Auch die Messungen, die wir vornahmen, haben diese Annahme bestätigt; während z. B. die Bacillen aus einer 24-stündigen Agarkultur bei 38° C nach der Karbolfuchsinfärbung durchschnittlich $0,98-1,33 \times 0,7-0,91 \mu$ groß waren, betrugen dieselben bei der mit Loeffler-Blau vorgenommenen Färbung nur $0,56-0,63 \times 0,35-0,52 \mu$. Eine solche Färbung ist schon deswegen ungeeignet, weil der Bacillus sehr leicht mit manchem anderen Coccus zu verwechseln ist, auch seiner Form nach. Die bessere Färbbarkeit mit Fuchsin als mit Methylenblau scheint beim z-Bacillus eine individuelle Differenz darzustellen, und es ist deshalb ratsam, stets nur von der Karbolfuchsinfärbung der Sicherheit wegen Gebrauch zu machen; $\frac{1}{2}-1$ Minute mittels $\frac{1}{10}-\frac{1}{20}$ mit destilliertem Wasser verdünnter Karbolfuchsinlösung ist die empfehlenswerteste Färbung, mit welcher der z-Bacillus ganz leicht zu erkennen ist.

Die sauren Anilinfarbstoffe färben ihn nur schwach und diffus.

Mit Karmin kann man überhaupt keine Färbung erzielen; bei der Hämatoxylinfärbung (Böhmer, Delafield) während $\frac{1}{2}-\frac{3}{4}$ Stunde läßt sich nur der zentrale Teil der Bakterienzelle schwach färben. Eisenhämatoxylin nach Benda oder Heidenhain liefert schon viel bessere Resultate.

Man kann die Färbung des lebendigen z-Bacillus auch im feuchten Zustande in der Weise vornehmen, daß zu einer in physiologischer Kochsalzlösung oder Bouillon gehaltenen Bakterienaufschwemmung einige Tropfen einer schwachen Methylenblaulösung zugesetzt werden; in einem Tropfen dieser Emulsion findet man dann, daß einige Bacillen den Farbstoff sehr stark, andere schwach und wieder andere gar nicht angenommen haben.

In lebendem Zustande läßt sich der z-Bacillus mit Neutralrot auch nach mehreren Stunden nicht färben, im fixierten Zustande dagegen sehr gut und zeigt eine schön differenzierte Struktur, so z. B. die oben beschriebenen besonderen Wuchsformen in Bouillon in fixierten Präparaten nach 10 Minuten langer Färbung: Die Keulen intensiv rot gefärbt mit transversaler blaßroter Streifung, die langen Bacillen mit intensiv roter bipolarer Färbung oder wie eine Reihe von roten Körnchen auf rosagelblichem Grunde; die typischen Formen haben ein zentrales rotes Körnchen, von einer rosafarbenen Schicht umgeben, andere Bacillen wieder waren im ganzen gelb gefärbt.

Mit Jodlösung läßt sich der z-Bacillus blaßgelb bis hellbraun färben, Stärkekörnchen sind nicht nachweisbar.

Wird ein mikroskopisches Präparat vor der Färbung mit NaOH- oder KOH-Lösung behandelt, so nimmt die Färbbarkeit der Bacillen ab, und zwar je mehr, desto länger die Alkalieinwirkung gedauert hat; bei allzulanger Einwirkung werden die Bacillen überhaupt fast nicht mehr färbbar.

Gramfärbung. Trotzdem eine Einteilung der Bakterien in grampositive und -negative keine wissenschaftliche wäre, so ist doch aus praktischen Gesichtspunkten von einer solchen nicht abzusehen, besonders bei der Differentialdiagnose der Bakterien. Da aber die Gram-Methode bis heute manche Modifikation erfahren hat, so ist es in jedem Falle ratsam, anzugeben, wie man die Methode angewandt hat.

Wir haben meist die alte ursprüngliche Gram-Methode, aber auch die verschiedenen Modifikationen derselben benutzt und für den z-Bacillus immer die gleichen Resultate erhalten. Am besten läßt man der Gram-

eine Kontrastfärbung folgen, z. B. mit Fuchsin. Für den z-Bacillus haben wir stets beständige Resultate bekommen, er verlor die Farbe nicht, auch nach einer ziemlich verlängerten Alkoholdifferenzierung (4—5 Minuten). Stets bleibt jedoch eine gewisse, sonst kleine Anzahl von Bakterien gram-negativ, und dieselben lassen sich mittels der Kontrastfarbe nachfärben; die Prozentzahl derselben ist eine verschiedene, je nach dem Alter der Kultur, wenige in jungen, zahlreichere in älteren Kulturen. Wir sind aber geneigt, dieselben für bereits abgestorben zu halten, da sie nur mit Fuchsin färbbar sind, mit Methylenblau aber nicht.

Ganz dieselben Resultate ergeben die verschiedenen Modifikationen der Gram-Methode, von denen wir bis jetzt die Weigertsche, Niccollesche und die von Claudius angewandt, und mit diesen schöne, saubere, von Niederschlägen freie Präparate erhalten haben.

Da der z-Bacillus sicher grampositiv ist, so ist seine Darstellung bei Schnittfärbung nach den üblichen Methoden leicht durchführbar.

Sporen oder sporogene Körnchen konnten wir beim z-Bacillus weder im lebenden Zustande, noch durch die speziellen Methoden entdecken. Der Verlust der Lebensfähigkeit bei 100° C nach sehr wenigen Sekunden bestätigt andererseits diese Tatsache.

Geißeln konnten wir niemals finden, trotzdem die verschiedensten Spezialfärbungen angewandt wurden (nach Loeffler, van Ermengem, Hinterberger, Zettnow, Gino de' Rossi); diese konstanten negativen Resultate stehen in gutem Einklang mit dem Mangel der Eigenbewegung. Der z-Bacillus ist also zu den Atricha zu zählen.

Säurefestigkeit. Niemals zeigte sich der z-Bacillus säurefest, sogar gegen verdünnte und nur kurze Zeit angewandte Säuren. Die Ehrlichsche, Ziehl-Neelsensche, Fraenkel-Gabbetsche, ja sogar die Weichselbaumsche Methode für säurefeste Bakterien, bei welcher letzteren keine Säure in Betracht kommt, haben stets negative Resultate geliefert und der Bacillus erschien mit der Kontrastfarbe tingiert. Auch die Bacillen, welche auf Nährböden mit starkem Kochsalz-zusatz kultiviert wurden, blieben ebenfalls nicht säurefest.

Kapseln. Bei aufmerksamer Betrachtung des z-Bacillus aus Sputum oder Kulturen auf eiweißhaltigen Nährböden (flüssiges oder koaguliertes Blutserum, Eiweiß) bei einem angemessenen Lichte im gefärbten Zustande sieht man, daß derselbe von einer dünnen, schwach refrangiblen Hülle umgeben ist, welche auch bei Anwendung der speziellen Kapselfärbungsmethoden kaum besser zur Darstellung zu bringen ist. Auch das Verfahren von Boni, nach welchem sich die Kapseln bei fast allen bekannten Bakterien gut tingieren sollten, versagt in diesem Falle fast immer, nur selten gelingt es, die Hülle sehr schwach rosa zu färben, doch zeigt sich dieselbe dicker und deutlicher. Das Bonische Verfahren scheint uns doch nicht schonend genug für die Bakterien zu sein, und es sind vielleicht diese Kapseln nur Kunstprodukte.

Das Weidenreichsche Verfahren ergibt ebenfalls negative Resultate.

Unter bestimmten, meist ungünstigen Bedingungen wird, wie wir weiter sehen werden, manchmal diese umgebende Hülle hypertrophisch und leichter sichtbar.

Babes-Ernstsche metachromatische Körnchen. Unter den vielen zu diesem Zwecke angewandten Färbemethoden haben wir

die besten Resultate mit dem Fallièresschen, Lubinskyschen und vor allem mit dem neueren Neisserschen Verfahren erzielt.

Diese metachromatischen Körnchen stellen beim z-Bacillus meistens Polkörner dar, die sich ziemlich gut und leicht färben und verhältnismäßig schwer entfärben lassen, einige Bacillen zeigen diese Färbung fast in ihrer ganzen Ausdehnung, so daß von einer totalen Metachromasie gesprochen werden kann, indem das metachromatische Körnchen beinahe ebenso groß wie der Bacillus selbst ist und sich stärker färben läßt, während das dünne periphere Plasma mit der Kontrastfarbe sehr schwach gefärbt, gar nicht oder nur sehr schwer sichtbar ist. Da, wo Polkörner in den Bacillen zu konstatieren sind, finden sich dieselben nur an einem Pole als einzeln vorkommende Verdichtungen des Protoplasmas. Viele Bacillen dagegen färben sich nur schwach, und zwar nur mit der Kontrastfarbe.

Dieses Auftreten der metachromatischen Körperchen erfolgt zwar nicht nur in 9—12-stündigen Blutserumkulturen bei 35° C, sondern auch auf jedem anderen Nährsubstrat unter den gewöhnlichen Bedingungen des Kulturanlegens.

Die besonderen Wuchsformen zeigten bei dieser Färbung, daß die meisten Bacillen je ein metachromatisches Körnchen an beiden Polenden hatten, einige dagegen nur an einem einzigen Pol, wieder andere noch mehrere solcher sind längs des Bacillus angeordnet.

Aus manchem Grunde sind wir geneigt, den z-Bacillus in die Gruppe der diphtherieähnlichen Bacillen einzuordnen, es wäre also ein dieser Gruppe angehörender Bacillus, welcher aber metachromatische Körnchen besitzt. Trotzdem die letzteren als ein wertvolles differentialdiagnostisches Zeichen zwischen den echten Diphtherie- und den diphtherieähnlichen Bacillen anzusehen sind, so bleibt es trotzdem keineswegs als etwa pathognomonisch zu betrachten. Als Beispiel hierfür neben anderen diphtherieähnlichen Bacillen, welche trotzdem wohlcharakterisierte metachromatische Körnchen besitzen und von verschiedenen Seiten bekannt gemacht worden sind, kann auch der z-Bacillus gelten.

Spezielle Färbungsmethoden. 1) Romanowsky. Für den feineren Bau der Bakterienzelle selbst haben wir die Romanowskysche Methode angewandt; bekanntlich läßt sich dabei nur das Entoplasma färben, das Ektoplasma bleibt immer ungefärbt, das Chromatin färbt sich rotviolett. Daher erscheint bei dieser Färbung der z-Bacillus kleiner als bei der Fuchsinfärbung. Die Präparate wurden teils in der Flamme, teils in absolutem Aethyl- oder Methylalkohol gut fixiert, nachdem gefärbt, und zwar zum Teil nach der neuesten Modifikation des Giemsaschen, zum Teil nach dem Procaschen Verfahren. Fast alle z-Bacillen erscheinen in der Mitte blau gefärbt und von einer rotvioletten, peripheren, dünnen Schicht umgeben, wenige hatten eine gänzlich blaue oder rotviolette Farbe mit blauen Körnchen. Eine schön differenzierte Färbung der inneren Teile des Bakterienleibes konnten wir nicht erzielen, auch nicht bei Bacillen aus ganz jungen Kulturen; das könnte dadurch seine Erklärung finden, daß das Chromatin mit dem Plasma sehr innig vermischt ist und daß die Plasmamasse überwiegt.

Dagegen erzielen die besonderen und die Involutionsformen eine viel bessere Färbung. Die langen Bacillen lassen sich rotviolett mit

blauen Körnchen von zuweilen polarer Lage, einigemal auch als eine Reihe von 3—4 hintereinander färben, noch andere Bacillen nehmen eine regelmäßig abwechselnde blaue und rotviolette Streifung an; gänzlich blau oder rotviolett gefärbte Bacillen konnten wir nur selten bemerken. Die Keulenformen waren gewöhnlich blaß rotviolett mit großen blauen Granulationen, manchmal mit abwechselnd blauer und rotvioletter Streifung, jedoch nur wenige gänzlich intensiv blau gefärbt.

2) Vitale Färbung nach Nakanishi. Im Gegensatz zur vorigen Methode läßt sich bei dieser nur das Ektoplasma der Bakterienzelle gut färben, während das Entoplasma blaß bleibt oder sich gar nicht färbt. Diese Methode hält die Mitte zwischen der Beobachtung im hängenden Tropfen und derjenigen im getrockneten, fixierten und gefärbten Präparate; es erweist sich als ein sehr schonendes Färbungsverfahren, welches in vivo eine gute differenzierte Färbung ermöglicht und dadurch Kunstprodukte sicherer ausschließt. Der Färbeprozess geht langsam und allmählich vor sich, wodurch sich viele Einzelheiten scharf und klar beobachten lassen. So haben wir bei jungen Kulturen des *z*-Bacillus sehen können, daß die Bacillen sich ungleich schnell färben, indem nämlich einige wenige schon gänzlich intensiv gefärbt erscheinen, sind andere noch gar nicht tingiert, wieder andere aber, und es sind eben die wichtigsten für unseren Zweck, zeigen ein merkwürdiges Bild: Die Peripherie (Ektoplasma) stellt sich als eine verhältnismäßig ziemlich breite, intensiv blau gefärbte, umgebende Schicht dar, während das Entoplasma anfangs hyalin und ganz farblos ist, jedoch später einen gelbgrünlichen Ton annimmt und schließlich blaßblau wird. Das Ektoplasma ist nach außen scharf begrenzt, beide Schichten sind aber nicht scharf gegeneinander abgegrenzt. Bei einigen Bacillen erscheint an einem Polende, zumeist beim dickeren, ein intensiv blauviolett gefärbtes Körnchen, bisweilen befindet sich dieses Körnchen auch in der Mitte, als ob es ein Kerngebilde wäre. Bei einigen etwas längeren Bacillen erblicken wir eine transversale, intensiv blau gefärbte Linie, wodurch der Bacillenleib wahrscheinlich gespalten wird.

Im Falle der besonderen Wuchsformen hat sich bei den langen Bacillen der Umkreis intensiv blau gefärbt und an einem oder wohl an beiden Polenden tritt ein intensiv blau gefärbtes Körnchen auf, während der Rest des Bacillus blaßblau bleibt; einigemal ist auch eine transversale Streifung zu sehen; bei anderen Bacillen wieder findet sich in der Mitte längsliegend ein Stäbchen, welches sich nach beiden Enden zu hantelförmig verdickt. Ab und zu begegnen wir auch Bacillen, welche ovale, große, intensiv aber einförmig gefärbte Kugeln enthalten. Die Keulenformen sind schwach blau gefärbt, mit transversaler Streifung oder mit einem blauen Körnchen versehen. Die sich darunter befindlichen typischen Formen des *z*-Bacillus zeigen die Peripherie intensiv blau gefärbt und haben in der Mitte ein blaues Körnchen oder eine transversale Linie.

* * *

Die Art und Weise, wie die osmotischen (Plasmolyse und -ptyse) und färbenden Verhältnisse beim *z*-Bacillus liegen, gibt Veranlassung dazu, über die feinere Struktur desselben folgende Ausführungen zu machen.

Der Zelleib dieses Bacillus besteht aus zwei Teilen: Aus einem Innenkörper, auch Entoplasma genannt, der sich allein mittels Methylenblau und nach Romanowsky färben läßt, und aus einem Außenkörper, dem Ektoplasma, welcher rings herum das Entoplasma wie eine Hülle umgibt und sich mit den eben genannten Farbstoffen nicht tingieren läßt, wohl aber mit Gentianaviolett, Fuchsin und auch nach der speziellen Nakanishischen Methode, und zwar färbt er sich immer bedeutend intensiver als der Innenkörper, die Abgrenzung zwischen den beiden bleibt jedoch eine unscharfe.

Was nun die Widerstandsfähigkeit dieser beiden Schichten gegen schädigende oder zerstörende Einwirkungen anbelangt, so ist folgendes dabei zu bemerken: Die plasmolytischen und -ptytischen Phänomene spielen sich ausschließlich auf Kosten des Entoplasmas ab, das Ektoplasma bleibt dabei intakt oder wird nur sehr wenig beschädigt; in alten Kulturen oder in Kulturen unter ungünstigen Bedingungen stirbt ein großer Teil der Bakterien ab und die Kadaver solcher bereits abgestorbener Bacillen erscheinen als sogenannte Bacillenschatten; die äußere Hülle, das Ektoplasma, bleibt wie ein scharfer, aber leerer Umriß bestehen, wie eine Membran, aus deren Inneren das Entoplasma verschwunden ist, so daß dadurch nur die frühere äußere Gestalt des Bacillus bestehen bleibt; nur diese äußere Membran allein läßt sich noch färben.

Aus alledem kann wohl richtig gefolgert werden, daß das Entoplasma aus einem flüssigen zarteren Plasma und das Ektoplasma aus einer modifizierten, konzentrierteren, festeren Substanz besteht, welche wie eine schützende Membran durch ihre Widerstandsfähigkeit gegen zerstörende Einwirkungen den zarten Bacillenleib umhüllt und auch nach seinem Zerfall innerhalb desselben, wie auch nach dem Tode des Bacillus als ein Skelett bestehen bleibt.

Züchtung.

Sobald der z-Bacillus in Reinkultur gewonnen ist, kann er sehr leicht und gut auf allen gebräuchlichen Nährsubstraten gezüchtet und so lange wieder auf frische Nährböden übertragen werden, als man nur will.

Betrachten wir aber speziell die einzelnen Nährstoffe, inwieweit dieselben günstig für sein Gedeihen sich verhalten, so gebührt den Eiweißstoffen unzweifelhaft der Hauptvorzug, wenn auch nicht alle derselben einen gleichen Einfluß ausüben; so kommt z. B. das flüssige oder koagulierte Blutserum nicht in erster Linie in Betracht, viel besser gedeiht er auf Agar und Bouillon, auch geht er auf Serum schneller zugrunde als auf Agar. Das ist eine spezielle Eigenschaft dieses Bacillus in seinem Verhalten, ebenso wie z. B. der Diphtheriebacillus viel besser auf Serum gedeiht und längere Zeit am Leben bleibt, während er sich dagegen auf Agar schlechter entwickelt und rascher zugrunde geht.

Dann kommt die Reaktion des Nährbodens in Betracht. Der leichteste Grad von saurer Reaktion verhindert von Anfang an das Wachstum vollkommen, dieselbe muß daher mindestens neutral sein. Eine leichte, aber deutlich alkalische Reaktion wird vom z-Bacillus am liebsten bevorzugt; er hat jedoch die merkwürdige Fähigkeit, bis zu einem gewissen Punkt eines verhältnismäßig ziemlich hohen Alkaligehaltes gut zu gedeihen, während jedoch noch größere Alkalimengen sein Wachstum mehr und mehr ungünstig beeinflussen, bis es gänzlich aufhört.

Von Wichtigkeit ist dann der Feuchtigkeitsgehalt der Nährböden, denn die Lebensfähigkeit des *z-Bacillus* erlischt bald in sich abtrocknenden Nährmedien.

Am besten gedeiht er unter aëroben Verhältnissen. Das Wachstum erfolgt gut und ziemlich schnell, auch bei Zimmertemperatur; jedoch viel besser und schneller im Thermostaten bei 37—38° C, wo man innerhalb 12—24 Stunden eine sehr gut entwickelte Kultur erhält.

Im Anfang, wenn der *z-Bacillus* kaum aus dem Sputum isoliert worden ist, ist seine Wachstumsenergie langsamer, kleiner und viel schwächer als später nachher, wenn er durch mehrmaliges Umzüchten sich in künstlicher Kultur angewöhnt hat, worin er allmählich ein üppiges Wachstum annimmt und seine Wachstumsenergie ziemlich stark und schnell wird.

Beim Wachstum auf festen Nährmedien bildet er gut charakterisierte Kolonien.

Die Kulturen haben auf allen Nährböden einen schwachen süßlichen Geruch.

Jetzt gehen wir zum Studium des Wachstums auf einzelnen Nährböden über.

Minerale (eiweißfreie) Nährmedien. Aus der Reihe derselben haben wir für den *z-Bacillus* das Fraenkelsche und das Proskauer-Becksche Nährsubstrat zur Züchtung angewandt; es sei hierbei bemerkt, daß der Fraenkelsche Nährboden keinen Schwefel enthält. Auf allen beiden wächst der *z-Bacillus* gut; in den ersten Tagen im Thermostaten bei 38° C entsteht eine gleichmäßige Trübung der Nährflüssigkeit, dann erfolgt vollkommene Abklärung und an den Boden setzt sich eine wenig reichliche, weiße, klebrige Schicht an, welche nur durch heftiges Schütteln wie eine schleimige Faser sich emporzieht und sich allmählich in die Flüssigkeitsmasse fein verteilt, bis eine gleichmäßige Emulsionierung stattfindet.

Eiweißhaltige Nährmedien. Bouillon. In schwach alkalischer, nach der Kochschen Methode bereiteter Peptonbouillon bildet der *z-Bacillus* schon nach 12 Stunden bei 38° C eine gleichmäßige Trübung; in den nächsten 2—3 folgenden Tagen zeigt sich an der Oberfläche der ruhig stehenden Bouillonkultur ein sehr feines, zartes, irisierendes, an der Kulturgefäßwand anhaftendes und hieran etwas aufsteigendes, eben an dieser Stelle besser sichtbares Häutchen, während am Grunde sich ein weißer, allmählich zunehmender Bodensatz bildet.

Nach Verlauf von im ganzen 4—5 Tagen klärt sich die Bouillon völlig ab, das Wachstum macht keine Fortschritte mehr und hört sogar ganz auf. Die Bouillonflüssigkeit einer solchen Kultur ist dunkler geworden, an der Oberfläche schwimmt das zarte bläuliche Häutchen und am Boden befindet sich ein weißlicher, ziemlich fester Niederschlag, welcher sich bei etwas kräftigem Schütteln des Glases in Form von schleimig-flockigen, kleinen Bruckstücken oder Wölkchen erhebt und zerteilt und sich dann in die Flüssigkeitsmasse fein und gleichmäßig emulsionieren läßt.

Die Reaktion der Nährflüssigkeit ist stärker alkalisch geworden, als sie im Anfang war, der Bodensatz enthält reichlich schöne glänzende prismatische Kristalle von phosphorsaurer Ammoniakmagnesia, mitunter so reichlich, daß man durch Filtrieren eine ansehnliche, für die chemische Analyse genügende Menge aus einer Kolbenkultur erhalten kann.

Die Neigung des z-Bacillus zu oberflächlicher Häutchenbildung kann noch viel besser unterstützt und bewiesen werden, wenn man denselben in einem Bouillonkolben besät und dann sofort so viel steriles Vaselineöl hinzugießt, bis sich auf der Bouillonoberfläche eine etwa $\frac{1}{2}$ cm dicke Schicht gebildet hat, hierauf bringt man das Kulturgefäß in den Thermostaten bei 38° C. Die Bacillen finden eine Stütze an der unteren Seite der Vaselineölschicht und bilden daselbst, wenn die Kultur ruhig stehen gelassen wird, ein verhältnismäßig dickeres, blauweißliches, an der Gefäßwand klebendes und etwas aufsteigendes Häutchen als vorher; dieses schwimmt auf der Bouillon und bei vorsichtigen Neigungsbewegungen des Kolbens läßt es sich gut in Falten legen. Manchmal wachsen von seiner Unterfläche nach abwärts in die Bouillon hinein feine Auswüchse und Ausläufer in Form tropfsteinartiger Gebilde. Zerrißt man das Häutchen durch kräftiges Schütteln und wird die Kultur weiter im Thermostaten gehalten, so bildet es sich nach kurzer Zeit wieder. Am Boden entsteht ein weißlicher Niederschlag.

Der Traubenzucker-, Milchzucker-, Hämoglobin- oder Hämatin-Zusatz zur Bouillon begünstigen ein reichlicheres und schnelleres Wachstum, der Glyzerin-Zusatz dagegen vermindert es.

Wendet man neutralisierte Bouillon mit Zusatz von ein paar Tropfen steriler Lackmus-Tinktur für die Kultur an, so wird die Kulturflüssigkeit schon nach 12 Stunden bei 38° C blau, doch wird in der Tiefe das Lackmus reduziert und daher farblos, durch Schütteln aber wird es wieder blau. Mikroskopisch sind die Bacillen etwas länger als gewöhnlich und oft zu zweien hintereinander angeordnet.

Im allgemeinen ist zu sagen, daß die Bouillon ein treffliches Nährmedium für den z-Bacillus ist, ohne aber ein allzu üppiges Wachstum desselben zu gestatten, sondern nur ein mäßiges; es bildet sich ein oberflächliches Häutchen, die Bouillon klärt sich aber verhältnismäßig schnell und völlig ab und setzt einen weißen Niederschlag am Boden nieder.

Das Peptonwasser ist weit weniger geeignet für die Züchtung des z-Bacillus als die Bouillon, das Wachstum ist verhältnismäßig schwach, hat aber Aehnlichkeit mit dem in Bouillon.

Bei der Züchtung in Milch verursacht der z-Bacillus die Gerinnung derselben weder nach kurzer Zeit noch nach Verlauf mehrerer Tage, die Bacillen setzen sich allmählich am Boden nieder. In mikroskopischen, fixierten, mit Aether gewaschenen und dann gefärbten Präparaten finden sich die Bacillen meist scharenweise angeordnet, dieselben sind jedoch sehr klein.

Die Lackmusmolke nach Petruschky stellt einen trefflichen Nährboden für den z-Bacillus dar. Binnen 12–24 Stunden bei 38° C entsteht eine gleichmäßige, intensive Trübung der Nährlösung, an der Oberfläche bildet sich, wenn die Kultur ruhig stehen gelassen wird, ein verhältnismäßig dickes, weißbläuliches Häutchen, welches der Kulturgefäßwand anhaftet und sich an derselben etwas emporhebt; manchmal ist das Häutchen mit zahlreichen Rissen durchzogen wie ein Mosaik. Die Farbe der Kulturflüssigkeit geht inzwischen allmählich ins deutlich Blaue über. In der Tiefe wird das Lackmus nicht oder nur selten reduziert, beim Schütteln wird es wieder oxydiert und färbt sich blau, durch das Schütteln reißt das Häutchen und verteilt sich gleichmäßig in die Flüssigkeitsmasse, bildet sich aber nachher leicht wieder. Nach

24 Stunden beginnt die Kultur sich allmählich abzuklären, bis sie schließlich ganz klar wird, am Grunde einen etwas schleimigen, weißgelblichen Bodensatz zurücklassend, welcher beim Schütteln in die Höhe steigt und sich in die Kulturflüssigkeit gleichmäßig verteilen läßt.

Verdünt man die Kultur mit der 3—4-fachen Menge destillierten Wassers zum Vergleiche mit einem sterilen und ebenfalls verdünnten Lackmusmolkeröhrchen, so werden die Flüssigkeiten viel durchsichtiger und die Umwandlung der Kulturlackmusfarbe ins Blaue sehr deutlich, der Schaum ist auch deutlich blau.

Mikroskopisch ist zu bemerken, daß die Bacillen etwas länger erscheinen, oft je zwei hintereinander oder in Form eines Zirkumflexakzents angeordnet sind.

Auf die Kulturen in Barsikowschen und in Klopstockschen Nährböden kommen wir weiter unten zu sprechen.

Die Gelatine wird niemals, auch nicht nach mehreren Tagen, vom z-Bacillus verflüssigt. Auf der Gelatineplattenkultur erscheinen nach 2—3 Tagen, bei Zimmertemperatur oder besser im Brutschrank bei 22° C, die oberflächlichen und die tiefen Kolonien ziemlich verschieden voneinander, und zwar sind die oberflächlichen bei schwacher Vergrößerung durchsichtig, größer und feiner gekörnt, in der Mitte etwas vorgewölbt, mit regelmäßigen Konturen, während dagegen die tiefer in der Gelatinemasse gelegenen kleiner, gelblich und gröber granuliert sind. Ein Doppelumkreis ist niemals, weder bei den oberflächlichen noch bei den in der Tiefe liegenden Kolonien wahrzunehmen. Aus dieser Struktur-differenz zwischen den tiefen und oberflächlichen Kolonien ist leicht zu ersehen, von welcher Wichtigkeit der freie Sauerstoffzutritt für die Entwicklung derselben ist.

In Röhrchen mit gerade erstarrter Gelatine entwickelt sich längs des Impfstriches nach 2—3 Tagen ein weißlicher, allmählich sich nach unten verengender zarter Streifen; bei aufmerksamer Betrachtung desselben mit Zuhilfenahme einer Lupe ist zu konstatieren, daß er aus einer großen Anzahl kleiner, dicht aneinandergereihter, weißer Kolonien zusammengesetzt ist.

Oben auf der Gelatineoberfläche, rings um den Impfstrich herum bildet sich eine weiße, flache, gut begrenzte, etwas erhabene, glänzende, runde oder vieleckige Platte, welche sich allmählich nach allen Seiten bis zu einer gewissen Größe ausdehnt.

In neutraler, mit ein paar Tropfen steriler Lackmustinktur zugesetzter Gelatinekultur wächst der z-Bacillus genau in derselben Weise, wie oben gesagt, nur macht sich hier ein frühzeitiges Blauwerden der Kulturfarbe bemerkbar.

Die Tatsache, daß keine Verflüssigungszone um dem Impfstrich herum auf der Gelatine entsteht, beweist, daß der z-Bacillus keine peptonisierenden Fermente hervorruft.

Der Agar stellt den allerbesten Nährboden sowohl für die Züchtung wie auch für die Isolierung des z-Bacillus dar.

Auf einer während 12 Stunden bei 38° C gehaltenen Agarplattenkultur lassen sich leicht bläuliche und irisierende, durchsichtige, flach gewölbte, regelmäßig runde, vereinzelt liegende Kolonien erkennen, deren sehr variabler Durchmesser zwischen einem kleinen Bruchteil bis höchstens $\frac{1}{3}$ mm schwankt.

Bei der genaueren Untersuchung der Kolonien mit schwacher Ver-

größerung erscheinen dieselben regelmäßig geometrisch rund, mit scharf begrenztem hellen Rande, selten nur hier und da mit leicht gezacktem Umkreis, in der Mitte sind sie dicker, die Dicke nimmt allmählich nach dem Rande zu ab; die ganze Kolonie ist gleichmäßig fein granuliert, und zwar ganz bis zum Rande. Manche Kolonien haben einen dunklen Punkt in ihrer Mitte, was sehr wahrscheinlich darin eine Ursache hat, daß diese Kolonien nicht aus einem Bacillus (oder nur sehr wenige), sondern aus einem kleinen Bacillenhafen stammen, je nach dem Zufall bei der Besäung; somit wäre der dunkle Punkt als das Keimzentrum der entsprechenden Kolonie anzusprechen.

Nach 24 Stunden Aufenthalt im Thermostaten bei 38° C sind alle Kolonien noch besser entwickelt, ungleich groß, die größten haben einen Durchmesser bis $\frac{1}{2}$ mm erreicht, die kleinsten bis $\frac{1}{10}$ mm und darunter, auch wenn sie isoliert sind; sie nehmen einen mehr weißlichen oder bläulich-weißlichen, etwas undurchsichtigen Ton an, bleiben regelmäßig rund und scharf umschrieben an den Rändern, ihre Oberfläche ist feucht, glänzend, bei allen ist eine allmähliche Abnahme der Dicke gegen die Peripherie zu konstatieren, ebenso eine kuppenartige Wölbung an der Oberfläche, so daß die Kolonien wie flach erhabene Knöpfchen aussehen.

Bei mikroskopischer Untersuchung mit schwacher Vergrößerung erscheinen die Kolonien etwas undurchsichtig, gelblich, gröber, aber gleichmäßig granuliert in ihrer ganzen Ausdehnung, niemals ist eine radiäre Streifung oder ein doppelter Umkreis festzustellen.

Mikro- und makroskopisch sind in der Agarmasse zahlreiche prismatische, glänzende Tripelphosphatkristalle sichtbar.

Auf dicht und weniger dicht besäten Agarplatten kann man oft sehr schön beobachten, wie die Kolonien, wenn sie auch dicht beieinander liegen, klein bleiben, trotzdem sie untereinander noch Platz genug zu weiterem Wachstum haben würden; dagegen an den Stellen, wo sie vereinzelt und weit voneinander sich befinden, groß wachsen. Wir haben früher gesehen, daß auch die Bouillonkultur, wenn auch daselbst das Wachstum ein nur mäßiges ist, vom 4.—5. Tage an vollkommen aufhört und die Kultur sich klärt. Daß dies auch beim z-Bacillus wahrscheinlich auf Erschöpfung der Nährmedien und hemmender Wirkung seiner Stoffwechselprodukte beruht, ist wohl denkbar, schwer ist nur die Frage zu beantworten, welches nun diese Stoffwechselprodukte sind und welches Maß diesen beiden Ursachen zukommt.

Auf einer 4—5—6 Tage alten Agarplattenkultur erreichen die vereinzelter Kolonien einen Durchmesser von 1 mm, zuweilen auch 2 mm, selten mehr; sie erscheinen dick, weiß, undurchsichtig, in der Mitte gewölbt. An den Stellen, wo die Kolonien zu dicht aneinanderlagen, sind sie zusammengefloßen und bilden jetzt einen weißen, glänzenden Belag, der aber nicht als gleichmäßig zu bezeichnen ist, was uns die genauere makro- und viel besser noch die mikroskopische Untersuchung mit Sicherheit erkennen läßt, denn die einzelnen Kolonien, welche zusammengefloßen erscheinen, sind noch sehr gut zu erkennen und zu individualisieren; der Umriß des Belages ist gelappt, polyzyklisch.

Bei den jungen Kolonien kommt die Bildung von schleimiger Intercellularsubstanz in nur relativ geringem Maße in Betracht, auch wenn sich etwas Schleim nachweisen läßt; bei älteren Kulturen aber läßt sich der Belag bei Berührung mit der Platinnadel etwas fadenziehend wie Schleim feststellen.

Trotzdem die Anordnung der Einzelindividuen in Kettenverbänden stattfindet und dadurch viel Aehnlichkeit mit den Streptokokken besitzt, entstehen doch keine Ausläufer (Randketten) am Rande der Kolonie, sondern derselbe bleibt immer ganz glatt.

Auf schräg erstarrtem Agar erscheinen zunächst nach 12 Stunden im Thermostaten bei 38° C bläuliche, leicht irisierende, durchsichtige und in der Mitte flach gewölbte Kolonien; dieselben werden später, nach Ablauf von 24 Stunden und mehr, weißlich, die Undurchsichtigkeit nimmt allmählich zu, sie sind größer, falls sie vereinzelt liegen, und kleiner, wenn sie dicht aneinandergruppiert sind, im letzteren Falle fließen die Kolonien oft zusammen und bilden einen etwas erhabenen, glatt konturierten, glänzend-weißlichen, ziemlich gut entwickelten Belag. Das anfangs trübe Kondenswasser klärt sich bald darauf ab und an dessen Boden setzt sich eine schleimige, weiße Schicht ab. Bei Berührung der Kolonien mit der Platinnadel läßt sich eine leicht zähe Konsistenz derselben konstatieren.

Sehr oft, wir möchten sagen fast immer, zeigen sich in den Agarkulturen zahlreiche prismatische, glänzende Kristalle; die meisten gehen unmittelbar von der Unterfläche der Kolonien nach der Tiefe zu aus, als ob sie ihre Herkunft damit beweisen möchten, es gibt aber auch genug in der Agarmasse. Die Kristalle liegen entweder vereinzelt oder meistens mitunter straußartig zusammengesetzt. Die chemische Analyse hat ergeben, daß es sich um Kristalle von phosphorsaurer Ammoniakmagnesia handelt.

Würde man für die Kultur des z-Bacillus einen Agar anwenden, bei dessen Bereitung statt Bouillon Peptonkochsalzwasser genommen wird, so bekommt man eine langsam sich entwickelnde, schwache, sogar kümmerliche Kultur.

In Röhrchen mit gerade erstarrtem Agar gibt der Impfstich einen sehr schnell nach unten sich verengenden, aus weißbläulichen feinen Kolonien zusammengesetzten Streifen, der viel schwächer ist als in der Gelatine; auf der Agaroberfläche bildet sich eine ebensolche Schicht wie auf der Gelatine. Das Wachstum des z-Bacillus, welcher überhaupt aërob ist, ist viel schwieriger in der Tiefe des Agars, der ein dichter und daher weniger luftpermeabler Nährboden als die Gelatine darstellt.

Die Besäung in der Agarmasse produziert gar keine Gase, auch wenn dem Agar begünstigende Substanzen zugesetzt worden sind, wie z. B. Traubenzucker etc.

Das Wachstum des erst jüngst isolierten z-Bacillus geschieht im Anfang bei den ersten Uebertragungen viel schwächer und langsamer als später, die Kolonien sind klein, zart, bläulich, irisierend, durchsichtig, glänzend und flach; nachdem er sich aber an das saprophytische Kulturleben gewöhnt hat, geht die Kultur schnell und glatt vor sich und nur unter bestimmten Bedingungen, insbesondere bei Glyzerinzusatz, wird das Wachstum wieder sparsam wie am Anfang, worauf wir weiter unten zurückkommen werden.

Bei einiger Uebung lassen sich die z-Bacillenkolonien auf Agarplatten bei schwacher Vergrößerung verhältnismäßig leicht unterscheiden oder wenigstens vermuten. Es interessiert nämlich, gerade auf Agar dieselben möglichst genau in ihren Charakteren unterscheiden zu können, da dieser den allerbesten Nährboden nicht nur für die Züchtung, sondern auch für die Isolierung des z-Bacillus abgibt. Eine Verwechselung ist

fast nur mit dem Streptococcus, Staphylococcus albus und Micrococcus catarrhalis möglich; die Kolonien des Pneumococcus und des Influenza-Bacillus kommen weniger in Betracht.

Der Unterschied bei den Streptokokken-Kolonien besteht darin, daß sie kleiner als die der z-Bacillen sind und bleiben, häufig ist ihr Rand zerrissen und haben gewundene Randketten; die Kolonien des Staphylococcus sind viel zu grob granuliert, zu groß und massiv gestaltet, um nicht leicht eliminiert werden zu können, während die Kolonien des Micrococcus catarrhalis sich stets durch einen unregelmäßig angefressenen Rand, der meist doppelt konturiert ist, auszeichnen. Pneumococcus-Kolonien sind ganz farblos, sehr zart punktiert, der Rand nicht ganz glatt, häufig etwas ausgefranst. Die Influenzabacillus-Kolonien und -ähnliche sind äußerst klein und zart, glashell, strukturlos.

Wenn also bei flüchtigem Ansehen die Kolonien des z-Bacillus leicht zu verkennen sind, ist es doch möglich, bei genauer Betrachtung und Übung nach dem Aussehen zu unterscheiden.

Auf neutralem schräg erstarrtem Lackmus-Agar produziert der z-Bacillus manchmal nach 12–24 Stunden bei 38° C einen Wechsel der Nährmediumfarbe. Am oberen Teil wird der Agar rot, während der des unteren Teils und das Kondenswasser eine blaue Farbe annehmen, sämtliche Kolonien sind aber bläulich. Wird die Kultur länger im Thermostaten gehalten und dann und wann betrachtet, so sieht man, wie allmählich die blaue Farbe von unten her emporsteigt und die rote von unten nach oben zurückdrängt, bis nach einigen Tagen die ganze Agarmasse blau wird. Diese merkwürdige Tatsache wäre vielleicht dadurch zu erklären, daß am unteren Teil des Agarröhrchens der Agar sich in dicker Schicht befindet und demnach der Luftzutritt schwächer ist, während am oberen Teil die Agarschicht sehr dünn und infolgedessen viel luftpermeabler ist. Wenn unter solchen Umständen der Agar etwas mehr als gewöhnlich an Kohlehydraten reich ist, was trotz sorgfältiger Bereitung des Nährbodens vorkommen kann, dann werden zuerst die Kohlehydrate angegriffen, und zwar nur dort, wo der Luftzutritt am stärksten ist. Unter normalen Bedingungen aber produziert der z-Bacillus Alkalien von Anfang an.

Auf Agar mit 3–5-proz. Glycerin-Zusatz wächst der z-Bacillus viel schwächer, seine Entwicklung geht schwieriger, langsamer vor sich, die Kolonien kommen über einen Durchmesser von $\frac{1}{2}$ mm nicht hinaus, sie sind durchsichtig, bläulich, sehr fein granuliert, in der Mitte ein wenig gewölbt und halten sich in ihrer Entwicklung auf. Ein Vergleich mit einer gleichzeitigen glyzerinfreien Agarkultur zeigt, daß die Entwicklung auf dem glyzerinhaltigen Nährboden zurückbleibt. Diese hemmende Wirkung ist noch stärker beim jüngst isolierten Bacillus, läßt sich aber auch beim gut an das Kulturleben angewöhnten Bacillus sehr deutlich erkennen: Die Glycerinagarkultur braucht einige Tage, um denselben Entwicklungsgrad wie eine einfache Agarkultur zu erlangen.

Mikroskopisch lassen sich auch Abweichungen entdecken. In einer 24-stündigen Glycerinagarkultur sind alle Bacillen verlängert (d. h. länger und schlanker als gewöhnlich). Die Erfahrung hat uns aber gelehrt, daß das Längerwerden des z-Bacillus fast immer auf ungünstige Bedingungen zurückzuführen ist. Nach 48–72 Stunden sind die Bacillen ungleichmäßig groß, die umgebende Hülle ist besser sichtbar als sonst,

Bacillenschatten. Nach 20 Tagen finden wir sehr ungleiche Mikroben, einige sind lang, andere fast rund, groß und intensiv gefärbt, zahlreiche Keulen und Bacillenschatten, die umgebende Hülle der einzelnen Bacillen ist vergrößert und gut zu sehen.

Die Lebensdauer auf Glycerinagar ist kürzer als auf gewöhnlichem Agar.

Hier möchten wir folgende allgemeine Bemerkung anknüpfen: Das Glycerin stellt zwar im allgemeinen einen trefflichen Nährstoff für die Bakterien dar, und in einem gewissen Zusatz zu den Kultur Nährböden begünstigt es das Wachstum derselben in merklicher Weise.

Nun behaupten wir auf Grund unserer Erfahrung, daß zwar das Glycerin das Wachstum der Bakterien begünstigt und die Kulturen derselben schneller und üppiger aufgehen, und zwar bis zu einem Grade, welcher sonst nicht erreicht würde, aber dieses Gedeihen ist zum Nachteil ihrer Lebensfähigkeit, denn die Lebensdauer ist eine kürzere und die Bakterien gehen schneller zugrunde. Zum Teil kann dies auch durch stärkeres Erschöpfen der nahrhaften Substanzen durch die üppigere und schnellere Entwicklung bedingt sein (aber auch durch andere Ursachen, wie Einfluß der Luft etc., wie bei allen Kulturen überhaupt), aber zum größten Teil ist dieser Prozeß dem Glycerin zuzuschreiben. Das Glycerin als dreiwertiger Alkohol hat nun eine schwache sterilisierende Kraft, welche sich nur auf die Dauer zeigt, ihre Wirkung ist eine sehr allmähliche; im Anfang spielt es die Rolle einer Nährsubstanz, um sie später mit derjenigen eines Giftes zu vertauschen.

Streng genommen ist die Einwirkung des Glycerins auf die verschiedenen Bakterien auch eine sehr verschiedene. Für einige wenige derselben, wie z. B. für den Tuberkelbacillus, ist das Glycerin so gut wie unentbehrlich, für andere, wie z. B. für den Rotzbacillus, Pseudodiphtheriebacillen etc. sehr vorteilhaft¹⁾, für andere wieder, wie für den Staphylococcus, Typhusbacillus fast gleichgültig. Es gibt aber auch solche Bakterien, für welche das Glycerin nicht nur unzweckmäßig, sondern sogar direkt schädlich ist, z. B. wie Weichselbaum für den Micrococcus meningitidis cerebrospinalis anführt: Der Glycerinzusatz fördert nicht das Wachstum desselben, ein Zusatz von 5-proz. Glycerin (wie üblich) verschlechtert es sogar.

Noch schärfer tritt diese giftige Wirkung des Glycerins beim z-Bacillus in die Erscheinung, während für das Wachstum des Czajlewski-Henselschen Bacillus der Glycerinzusatz günstig ist.

Wir sehen also, wie für verschiedene Bakterienarten, manchmal sogar sehr verwandte, oder zu verschiedenen Zeiten der Entwicklung, eine und dieselbe Substanz Nährstoff und Gift sein kann, und wie die Begriffe Nährstoff und Gift ineinandergreifen. Dasselbe könnte man an Beispielen für andere Substanzen ebenfalls beweisen. Aus diesen Gründen halten wir die Vorschrift, in jedem Fall Glycerinagar zu gebrauchen, wie dies in einigen Laboratorien üblich ist, für unzweckmäßig.

Im Gegensatz zum Glycerin begünstigen andere dem Agar zugesetzte Substanzen, wie z. B. Mannit, Milch- und besonders 0,5–1,0-proz. Trauben- und Rohrzucker, ein sehr reichliches Wachstum, die einzelnen Kolonien können schnell einen Durchmesser von 1 mm und darüber erreichen.

1) Für den Diphtheriebacillus hat Kitasato mit Erfolg auch 10-proz. Glycerinagar angewandt.

Der Zusatz von Eidotter, von sehr kleinen Mengen Lecithin, von Blut fördert auch beträchtlich sein Wachstum; das Blut kann auf der Oberfläche ausgebreitet sein oder noch besser mit dem Agar vermischt werden (Bezançon-Griffonscher Nährboden).

Hämoglobin und Hämatin wirken auch vorteilhaft, besonders auf Hämatinagar zeigt sich eine schnelle reichliche Entwicklung. Die Bereitung des Hämatinagars haben wir folgendermaßen vorgenommen (ungefähr nach den Angaben von Ghon und Preisz): Eine 5-proz. in 0,5-proz. NaOH-Hämoglobinlösung oder das feingeschnittene Koagulum von etwa 100 ccm Blut (ohne Blutserum) mit 100 ccm der 0,5-proz. NaOH-Lösung wird längere Zeit bis zur vollständigen Lösung gekocht, dann sterilisiert und in Proportion von etwa 10 Proz. dem auf 50° abgekühlten flüssigen Agar zugesetzt, vorsichtig gemischt und erstarrt. Es ist ein vorzüglicher Nährboden für viele Bakterien, auch lassen sich sehr gut Influenzabacillen züchten, wenn man in der Nachbarschaft auch einen Strich mit *Staphylococcus aureus* macht.

Auf Agar mit sterilisiertem Sputum auf der Oberfläche bestrichen, wächst der z-Bacillus reichlich zu einem ziemlich dicken weißlichen Belag.

Auch auf allen diesen Nährböden ist das Wachstum von einer reichlichen Bildung von Tripelphosphatkristallen begleitet.

In flüssigem sterilen Blutserum entwickelt sich der z-Bacillus gut zu einer allgemeinen Trübung, welche sich dann abklärt.

Meistens haben wir einen flüssigen Blutserumnährboden in der von Prof. Dr. G. Proca empfohlenen Weise, bei welchem man sicher ist, einen ganz sterilen Nährboden zu erhalten, angewandt. Blutserum (hämoglobinfrei) oder seröses pleuritische Exsudat wird in der Proportion 1:4 mit destilliertem Wasser (1 Teil Serum + 3 Teile destilliertes Wasser) in einem Kolben sorgfältig gemischt, in einem Wasserbad bis zum Kochen desselben gehalten und dann im Autoklaven bei 115 bis 120° C während 20—30 Minuten sterilisiert. Es tritt keine Gerinnung auf, und es erweist sich als ein ausgezeichneter Nährboden; auch Glyzerin etc. läßt sich zusetzen.

Statt des Blutserums bzw. Pleuraexsudates kann man auch Ascites- oder Hydrocelenflüssigkeit anwenden, doch ist in diesen Fällen die Verdünnung in anderer Weise vorzunehmen.

In dieser Nährflüssigkeit entwickelt sich der z-Bacillus schnell und gut, bringt eine allgemeine Trübung hervor, welche sich aber nach einigen (2—3) Tagen abklärt. Bemerkenswert ist, daß die Bacillen umgebende hyaline Hülle besser entwickelt und leichter sichtbar ist.

Das koagulierte Blutserum zeigte sich stets weniger geeignet für die Züchtung des z-Bacillus als der Agar; das Loeffler-Serum erweist sich besser als das einfache Menschen- oder Rinderblutserum.

Auf dem Loefflerschen Nährboden bildet der z-Bacillus nach 20—24 Stunden bei 38° C weiße, runde, gut begrenzte, etwa undurchsichtige, in der Mitte ein wenig erhabene Kolonien; dieselben werden größer (bis zu 1 mm Durchmesser), wenn sie isoliert sind, kleiner ($\frac{1}{4}$ mm und weniger), wenn sie dicht aneinanderliegen; in letzterem Falle fließen sie oft zusammen und bilden einen weißen Belag. Das anfangs trübe Kondenswasser klärt sich allmählich ab und läßt am Grunde einen weißlichen, etwas schleimigen Bodensatz zurück.

Auf koaguliertem Rinder- oder Menschenblutserum ist das Wachstum etwas langsamer und schwächer als auf dem Loeffler-Serum.

Auf festen Serumnährboden sind die einzelnen Bacillen bedeutend größer als auf allen anderen Nährböden, die umgebende hyaline Zone ist deutlicher zu erkennen; nur einige wenige Bacillen erscheinen ungewöhnlich verlängert und zeigen intensive bipolare Färbung, es handelt sich um in Teilung begriffene Formen.

Auf durch Hitze koagulierte Hühnereiweiß geht das Wachstum sehr langsam vor sich, erst nach 2—3 Tagen bei 38° C beginnen sich kleine runde, kaum sichtbare, wenig glänzende, in der Mitte etwas flach gewölbte, weiße Kolonien zu bilden, welche sich von der Nährbodenfarbe schwer unterscheiden lassen; da, wo die Kolonien dicht aneinander liegen, fließen sie zusammen und stellen einen sehr dünnen weißen Streifen oder Belag dar. Die Bacillen erscheinen kleiner als auf anderen Nährböden, fast kugelförmig, ungleich groß, meist paarweise nebeneinander angeordnet, von einer refringiblen, gut sichtbaren und ziemlich dicken Hülle umgeben.

Für die Züchtung auf Kartoffeln haben wir das Ausschneiden der nötigen Scheiben nicht mit einem gewöhnlichen Messer vorgenommen, sondern mit einem scharfen Knochenmesser, um die sonst gewöhnliche trotz aller Vorsicht hinterher erscheinende Schwärzung derselben zu verhindern; in dieser Weise behalten die Kartoffelscheiben dauernd ihre natürliche Farbe. Da aber die Kartoffeln meistens sauer reagieren und der z-Bacillus dazu sehr empfindlich ist, so haben wir die Scheiben mehrere Stunden in einer 10-proz. Sodalösung liegen lassen, danach gründlich in Leitungswasser abgespült und zweimal im Autoklaven bei 120° C je ½ Stunde lang sterilisiert.

Auf diesem Nährboden wächst der z-Bacillus sehr gut und bildet nach 24—48 Stunden bei 38° C längs des Impfstrichs eine feuchte, glänzende, scharf begrenzte, etwas erhabene hellbraune Schicht. Diese Pigmentbildung ist nicht strikt an den Bakterienrasen gebunden, sondern diffundiert auch in die übrige Oberfläche der Kartoffelscheibe.

Es ist zu bemerken, daß beim z-Bacillus diese Pigmentbildung nur auf Kartoffeln zu beobachten ist. Das in Roux'schen Röhrchen am Boden befindliche Kondenswasser ist anfangs trübe, dann klärt es sich allmählich ab.

Endlich haben wir auch die Kultur in Kollodium- und Schilfsäckchen (von der inneren Membran des Schilfrohrs hergestellt), welche in die Peritonealhöhle von Kaninchen und Meerschweinchen eingelassen wurden, vorgenommen. Als Inhalt wurde physiologische Kochsalzlösung, Bouillon, Blutserum oder die oben erwähnte 1:4 Verdünnung des Blutserums benutzt. Man bekommt auf diese Weise eine reichlich entwickelte Kultur.

Berlin, März 1909.

Nachdruck verboten.

Ein neuer hämophiler Bacillus, gefunden bei einem Falle von Meningitis spinalis.

[Aus dem Pasteurschen Institut von São Paulo, Brasilien
(Direktor: Prof. Dr. A. Carini).]

Von Dr. Ulysses Paranhos, Assistenten.

Im Jahre 1890 beschrieb Prof. R. Pfeiffer¹⁾ unter dem Namen Influenzabacillus einen besonderen Mikroorganismus, welchen er in großer Menge in dem Auswurf von Grippekranken gefunden hatte. Dieser Bacillus Pfeiffers, dessen Spezifität so oft erörtert worden ist, besitzt eine große Bedeutung, da er eine Bakteriengruppe für sich darstellt.

In der Tat läßt sich aus der Beschreibung Pfeiffers ersehen, daß dieser Mikroorganismus, im Gegensatz zu anderen Keimen, besondere Eigenschaften hat:

- a) geringe Größe;
- b) beschränkte Lebensfähigkeit;
- c) entwickelt sich nur in hämoglobinhaltigen Nährböden.

Da infolge der schon beschriebenen Entdeckung häufiger hämoglobinhaltige Nährböden benutzt wurden, wurden neue Keime mit Kennzeichen des Influenzabacillus beschrieben.

Unter diesen sind erwähnenswert:

- 1) Pseudoinfluenzabacillus (Pfeiffer).

Diese Keime wurden isoliert bei der Sektion dreier Fälle von Bronchopneumonie, die sich unbeeinflusst von jeder Grippeepidemie entwickelten. Um diese Bakterien von dem eigentlichen Grippebacillus zu unterscheiden, hat man behauptet, daß sie eine größere Ausdehnungsfähigkeit zeigten und in der Kultur Fäserchen bildeten. Heute ist die Identität des Pseudoinfluenzabacillus mit dem ursprünglichen Grippebakterium von allen Seiten und sogar von Pfeiffer selbst anerkannt.

- 2) Bacillus de Elmassian²⁾, 3) Bacillus de Luzzato³⁾.

Diese Bacillen besitzen dieselben Eigenschaften, wie die vorhergehenden, außer daß sie sich für das Kaninchen als pathogen erweisen.

- 4) und 5) Bacillus pertussis Spengler und Bacillus pertussis Jochmann und Kraus⁴⁾.

Früher als Erreger des Keuchhustens beschrieben, werden sie heute als Saprophyten der Atmungswege angesehen, oder, gemäß anderen Autoren, als der eigentliche Influenzakeim, der sich dem Keuchhusten beigesellt.

- 6) Bacillus (Meunier)⁵⁾.

In einigen Fällen von infantiler Bronchopneumonie beschreibt dieser Autor einen Bacillus, den er für analog mit dem Influenzabacillus hält; es scheint indessen ein besonderer Keim zu sein, da er sich im Blut findet, wo der Bacillus Pfeiffer selten angetroffen wird.

1) Pfeiffer, Zeitschr. f. Hyg. Bd. XIII. 1893.

2) Elmassian, Ann. de l'Inst. Pasteur. T. XIII. 1892. p. 621.

3) Luzzato, Centralbl. f. Bakteriöl. Bd. XXXIII. 1903. p. 401.

4) Kraus, Zeitschr. f. Hyg. Bd. XXXVI. p. 193.

5) Meunier, Arch. gén. de méd. 1897. p. 129.

7) *Bacillus catarrhalis*¹⁾.

Jundel isolierte in 30 Fällen von akuter Bronchitis, welche er untersuchte, 3mal einen *Bacillus*, der sich nur auf Hämoglobinnährböden züchten ließ.

8) *Bacillus haemoglobinophilus canis*²⁾.

Friedberger studierte einen hämoglobinen *Bacillus* aus dem Präputialsekret eines Hundes, der sich den Laboratoriumstieren gegenüber nicht als pathogen erwies.

9) *Bacillus Wolff*³⁾.

Aus einer durch künstlich hervorgerufenen Sonnenstich getöteten Ratte isolierte Wolff einen hämoglobinophilen Keim, der in den Kulturen Fädchen erzeugte und sich Tieren gegenüber wenig virulent erwies, mit Ausnahme der Maus, für die er ein wenig pathogen ist.

10) *Bacillus septicaemiae canis*⁴⁾.

Im Jahre 1905 isolierten wir aus dem Blut einer an hämorrhagischer Septikämie gestorbenen Hündin einen *Bacillus*, der sich nur auf hämoglobinhaltigen Nährböden züchten ließ und wenig pathogen für den Hund war. Die eben besprochenen Keime haben die drei charakteristischen Merkmale des *Bacillus Pfeiffers* und empfangen wegen ihrer besonderen Eigenschaft, sich in hämoglobinhaltigen Nährböden zu entwickeln, den Namen *Bacillus haemoglobinophilus*. Wir müssen noch hervorheben, daß einige dieser Keime absolut nur in hämoglobinhaltigen Nährböden gedeihen, wie z. B. der Influenzabacillus, während andere sich an Nährböden gewöhnen können, die dieser Substanz entbehren: die ersteren können wir haeminoglobinophilos estictivos, die letzteren haeminoglobinophilos facultativos benennen. Den hämoglobinophilen Bacillen fügen wir noch einen anderen hinzu, der kürzlich von unserem verehrten Direktor Prof. Dr. A. Carini aus der Cerebrospinalflüssigkeit isoliert wurde. Wir danken ihm dafür, uns das Studium des neuen Keims anvertraut zu haben.

Am 26. September stellte Dr. Rangel Pestana dem Institute Pasteur eine Portion Cerebrospinalflüssigkeit zu, welche er mittels Lumbalpunktion von einem 12-jährigen Knaben erhalten hatte, der nach einer Verletzung Symptome einer entzündlichen Reaktion der Meningen zeigte. Dieser Kranke zeigte später eine Infektion mit Typhus. In der Zeit, wo die Flüssigkeit extrahiert wurde, war die Serumagglutination von Widal negativ. Der Kranke wurde gesund.

10 ccm der Flüssigkeit wurden im Institute Pasteur bei 120° C sterilisiert. Ihr Aussehen war leicht trüb. Die nach verschiedenen Methoden fixierten und gefärbten Präparate (Hämetineosin, Unna-blau, Giemsa'sche Lösung) zeigten einige Leukocyten, größtenteils polynukleär und spärliche rote Blutkörperchen. Zunächst wurden keine Bakterien angetroffen, und erst nach einer langen Prüfung zahlreicher Präparate gelang es uns, einige extracelluläre Doppelbakterien zu sehen. Nach reichlicher Aussäung des Materials in verschiedenen Nährböden erwiesen sich alle als steril, mit Ausnahme des Blutagars, selbst nach mehrtägigem Verweilen im Brutschrank. Die Kolonien, die sich im Blutagar entwickelten, zeigten den Keim, den wir studiert haben.

1) Jundel, Hygea. Bd. LX. p. 667.

2) Friedberger, Centralbl. f. Bakt. Bd. XXX. 1903. p. 401.

3) Wolff, Centralbl. f. Bakt. Bd. XXXII. 1903. p. 407.

4) Paranhos, Gazeta clinico u. Recueil de méd. vétérinaire. 1906.

Morphologie. Es handelt sich um einen kleinen polymorphen Bacillus, 2mal so lang als breit, bald gerade, bald leicht gekrümmt, in der Mitte mit einem kleinen lichten Zwischenraum. Er zeigt eine gewisse Neigung, sich zu gruppieren, und zwar im allgemeinen in Palissadenform, der Bacillus ist unbeweglich und hat weder Sporen, noch Kapsel noch Geißeln. In den etwas älteren Kulturen zeigen sich Rückbildungsformen, mehr oder weniger geschwollen, mit dem Aussehen von Nägeln.

Der Bacillus läßt sich leicht mit allen basischen Anilinderivaten färben. Die besten Resultate erhält man mit Karbolfuchsin in 10-facher Verdünnung. Es nimmt Gram, Nicolle und Claudius gut an und widersteht der entfärbenden Wirkung des Eisessigs der ersten Methode gut. Durch Säuren entfärbt es sich und zeigt nicht die metachromatischen Körperchen von Babes.

Kulturen. Pflanzte sich im Blutagar fort (1 Teil defibriniertes Pferdeblut auf 2 Teile gewöhnlichen Agars). Nach 48 Stunden beobachtet man kleine, runde Kolonien, oft linsenförmig granuliert, die isoliert sind und wenig Neigung zum Zusammenfließen haben. Eine Entfärbung des Nährbodens tritt nicht ein. In den mit Eisensalzen versetzten Nährböden (Ferratina 5 Proz.) wächst der Mikrobe nicht. Keine Entwicklung zeigt sich in den Kulturen, die mit Bouillon, Serumbouillon, gewöhnlichem Agar, Glykoseagar, Glyzerinagar, Serumagar, Gelatine, Kartoffel und Peptonwasser gemacht worden sind. Die beste Temperatur ist 37° C. Der Keim entwickelt sich nicht unter 25° C und über 40° C.

Einimpfungen. Die subkutanen, endovenösen, intraperitonealen und endomeningealen Einimpfungen beim Hund, Kaninchen, Meerschweinchen und Taube waren negativ. Nur eine Taube, der am 9. Oktober 1/2 g der Emulsion mittels Platinöse von 48-stündigem Blutagar in 2 g physiologischer Kochsalzlösung ins Gehirn okultiert worden waren, starb am 16. desselben Monats.

2 Tage vor dem Tode zeigte das Tier Traurigkeit, Niedergeschlagenheit und verweigerte die Nahrungsaufnahme.

Bei der Autopsie zeigte sich eine allgemeine Blutüberfüllung in den Eingeweiden, vorherrschend in der Leber und den Lungen. Nach Färbung mit Thionineosinorange fanden sich vereinzelte kleine Bacillen in den Abstrichpräparaten.

In den Kolonien, die mit Blut, das mittels aseptischer Herzpunktion gewonnen wurde, angestellt wurden, zeigte sich auf den gewöhnlichen Nährböden keine Entwicklung, während im Gegenteil auf gewöhnlichem Blutagar Kolonien mit den Merkmalen des eingepfunden Bacillus wuchsen.

Lebensfähigkeit. In Blutagar bewahrt die Kultur ihre Lebensfähigkeit 15 Tage. Die Austrocknung bei gewöhnlicher Temperatur und bis 37° C zerstört den Keim, dasselbe geschieht, wenn man die Kolonien während einer Viertelstunde einer Temperatur von 60° C aussetzt.

Der Keim ist sehr empfindlich gegen chemische Antiseptika. Die wöchentliche Versetzung der Kulturen genügt, um seine Lebensfähigkeit zu erhalten.

Nachdruck verboten.

Formveränderungen bei Trypanosomen der Nagana.

[Aus dem Kgl. Institut für Infektionskrankheiten in Berlin
(Direktor: Geh. Obermedizinalrat Prof. Dr. Gaffky,
Abteilungsleiter: Prof. Dr. C. Schilling).]

Von J. Jaffé, Assistenten am Institut.

Mit 1 Tafel.

In dem Blute von Ratten, die mit einem ursprünglich von Prof. Schilling aus Togo mitgebrachten, nun schon seit einer Reihe von Jahren im Laboratorium in Mäusen fortgezüchteten Nagana-Stamme infiziert waren, fanden sich Trypanosomenformen, die ganz wesentlich von den bisher beobachteten abweichen, und die ich deshalb kurz beschreiben möchte.

Die in Frage kommenden Trypanosomen besitzen, wie aus dem beigelegten Photogramm sowie aus den Zeichnungen ersichtlich ist, im Gegensatz zu den anderen normalen Individuen der gleichen Präparate eine gedrungene, plumpe und bedeutend breitere Gestalt. Die Länge beträgt durchschnittlich 32 μ , die größte Breite 6 μ . Die Geißel ist kurz. Im frischen Präparat fallen sie schon durch ihre Größe auf, zeichnen sich aber außerdem durch die Art ihrer Bewegung aus, sie kriechen förmlich durch das Gesichtsfeld und besitzen nicht die elastische peitschende Beweglichkeit der normalen Formen. In dem nach Romanowsky gefärbten Präparate erscheint das Protoplasma rötlich-blau, gleichmäßig alveolär. Der Kern ist groß, rund, sukkulent und läßt keine deutliche Struktur erkennen. Der Blepharoplast ist klein, rundlich und liegt am Hinterende hart am Rande einer großen Vakuole. Im Protoplasma sind bald mehr, bald weniger rötlich violett gefärbte Granula regellos verteilt. Teilungsstadien nach dem Modus der Längsteilung (s. Abbildung) konnten beobachtet werden.

Die Zahl dieser breiten Formen im Vergleich zu den normalen ist schwankend. Sie kommen teils nur in wenigen Exemplaren, teils ebenso zahlreich wie die übrigen Formen vor.

Zuerst wurden sie im Blute einer mit Arsenophenylglycin behandelten Ratte, der einzigen, die an einem Rezidiv (wahrscheinlich infolge eines Versuchsfehlers) erkrankte, gefunden, so daß der Gedanke nahelag, die Formveränderung dem Einfluß des Arsenicale zuzuschreiben. In der Folge aber fanden sie sich auch im Blute nicht behandelter Ratten, so daß ihr Auftreten auf einen therapeutischen Einfluß nicht zurückgeführt werden kann. Sie wurden bisher nur auf der Höhe der Infektion bis zum Tode der Ratte, niemals im Anfange der Infektion beobachtet. Nicht jede einzelne, mit dem betreffenden Stamm infizierte Ratte hatte sie in ihrem Blute aufzuweisen. Regellos bald in dem einen, bald in dem anderen Tiere traten sie auf, ohne daß die Umstände, die ihr Erscheinen bewirkten, erkenntlich wurden. In vereinzelt Fällen, und dann nur in ganz wenigen Exemplaren, fanden sie sich auch im Blute von Mäusen, die mit demselben Stamme infiziert waren.

Gewisse morphologische Unterschiede zwischen den einzelnen Individuen des Trypanosoma Brucei können auf der Höhe der Infektion.

Fig. 1.

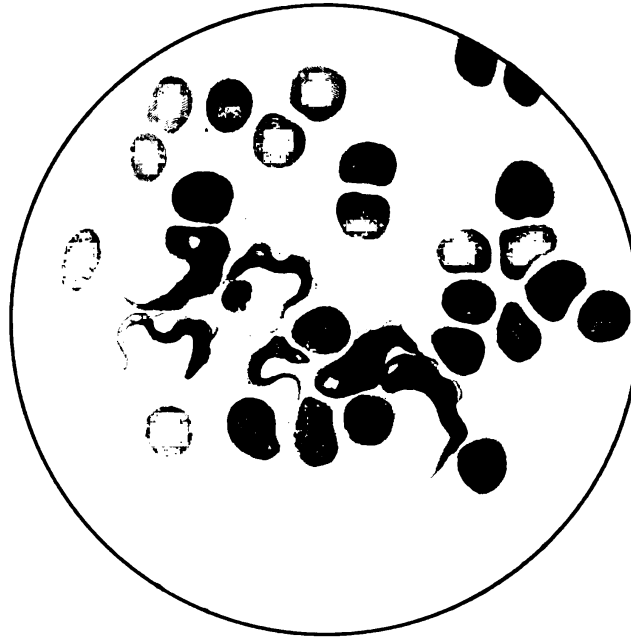


Fig. 2.

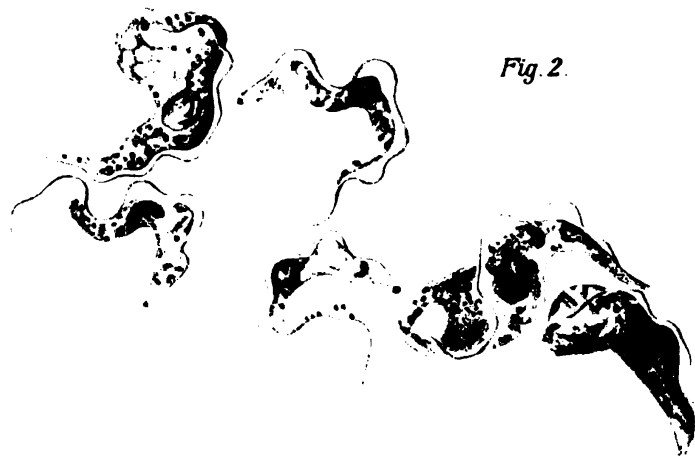


Fig. 3.



Netnow phot

L. Krause gez

Verlag von Gustav Fischer in Jena.

Lith Anst v Johannes Arndt Jena

und namentlich nahe vor dem Exitus, in jedem Präparate gefunden werden. Ueber bedeutendere Formenveränderungen im Rattenblut, die durch vorhergehende Igelpassage verursacht sein sollen, hat Fellmer im Centralbl. f. Bakteriologie. Abt. I. Orig. Bd. XLV. Heft 6 berichtet. F. fand im Rattenblut vielkernige Individuen mit einer großen Anzahl Blepharoplasten und einem ganzen Gewirre von Geißeln, für deren Natur als atypische Teilungsvorgänge oder atypische Konjugationsformen sie sich nicht entscheiden möchte. Gonder und Sieber (Centralbl. f. Bakteriologie. Abt. I. Orig. Bd. XLIX. Heft 3) betonen das Vorkommen der von Fellmer beschriebenen atypischen Formen als normalen Befund bei den meisten Trypanosomen und stellen den Einfluß der Igelpassage in Abrede. Daß Passagen in verschiedenen Tierarten recht wohl einen Einfluß auf die Formveränderung der Trypanosomen der Nagana ausüben können, zeigen die Befunde von Martini (Zeitschr. f. Hygiene. Bd. L). Nach seinen Untersuchungen können die Trypanosomen ein und desselben Stammes bei einem Tier, z. B. beim Hund und Kaninchen, groß und langgeißelig, bei anderen, wie Schwein und Büffel, auffallend klein und kurzgeißelig sein.

Was für eine Bedeutung die von mir beschriebenen breiten Formen besitzen, ist nicht zu entscheiden. Ziemann hat als erster den Gedanken ausgesprochen, daß derartige morphologische Unterschiede den Ausdruck einer geschlechtlichen Differenzierung darstellen, eine Ansicht, die nach Prowazeks Untersuchungen an Wahrscheinlichkeit gewonnen hat. Der ausgesprochene alveoläre Bau des Protoplasmas, der große aufgelockerte Kern, wie wir bei unseren Formen sehen, legen in Analogie mit den für *Trypanosoma Lewisii* beschriebenen ähnlichen Formen die Möglichkeit nahe, daß wir es auch hier mit weiblichen Individuen zu tun haben. Möglicherweise ist auf die charakteristische Ausbildung dieses Typus die lange Fortzucht im Laboratorium, das Fehlen des Zwischenwirtes von Einfluß gewesen. Der Einwand, daß es sich hier um Degenerationsformen handeln könnte, wird hinfällig durch das Auftreten von Teilungsformen, sowie durch das mitunter massenhafte Erscheinen auf der Höhe der Infektion. Jedenfalls spricht das plötzliche Auftreten dieser früher bei unserem Stamme noch niemals beobachteten Formen für die große Variabilität des Trypanosomenkörpers, dessen Anpassungsvermögen sich nicht nur, wie bekannt, auf seine biologischen, sondern auch auf seine morphologischen Eigenschaften erstreckt.

Tafelerklärung.

Fig. 1. Gruppe von breiten und schlanken Formen, phot. Zettnow. Vergrößerung 1000.

Fig. 2. Dieselbe Gruppe gefärbt nach Romanowsky, gezeichnet mit dem Abbesehen Zeichenapparat. Vergrößerung 2000.

Fig. 3. Teilungsform gefärbt nach Romanowsky, gezeichnet wie Fig. 2.

Nachdruck verboten.

Protozoonbefunde bei Typhus exanthematicus.

[Aus dem II. pathologisch-anatomischen Institut der Universität in Budapest
(Direktor Hofrat Prof. Dr. O. Pertik).]

Von

Dr. E. Krompecher, Dr. M. Goldzieher und Dr. J. Augyán
Dozent. Assistent. Praktikant des Instituts.

Mit 1 Tafel.

Im Frühling des Jahres 1908, kam in Budapest eine Flecktyphus-epidemie zum Ausbruch, welche sich bis gegen den Sommer hin erstreckte. Der erste Fall wurde am 21. Februar im St. Ladislaus-Spital diagnostiziert und durch die Sektion bestätigt. Im ganzen wurden 203 Fälle beobachtet, wovon 91 auf Männer und 110 auf Weiber entfielen. Kinder unter 10 Jahren erkrankten 15mal. Der Verlauf der Epidemie muß als schwer bezeichnet werden, indem 53 Todesfälle verzeichnet wurden, was eine Mortalität von 26,3 Proz. ausmacht.

Im St. Ladislaus-Spital, dessen Prosektor Hofrat Prof. Dr. Pertik ist, hatten wir Gelegenheit, sämtliche 53 Fälle zu obduzieren. Der lebenswürdigen Erlaubnis des Herrn Dozenten Gerlóczy's, Primarius des Spitals, verdanken wir die Möglichkeit, auch das Blut der an Typhus exanthematicus Leidenden zu untersuchen, und zwar insgesamt in 48 Fällen. Sowohl das Leichenmaterial als auch das Blut der Kranken wurde bakteriologisch, kulturell und auch mikroskopisch untersucht, unter Anwendung der in der Bakteriologie, Histologie und zur Blutuntersuchung angegebenen neuesten Verfahren.

Das größte Gewicht wurde auf das Studium des Blutes der Lebenden gelegt. Die Ausstrichpräparate wurden stets nach Giemsa und hier und da auch nach Manson gefärbt. Ganz besonders muß betont werden, daß Bedingung positiver Befunde tadellose Giemsa-Färbung ist. In solchen Präparaten fanden wir Gebilde, deren morphologisches und tinktoriell Verhalten, wie auch das Vorkommen innerhalb der Erythrocyten, Protozoen entspricht und teils an Piroplasmen, teils an Malaria plasmodien erinnert, aber keiner der beiden Protozoonarten völlig gleicht.

Am häufigsten fanden wir ungemein kleine, teils extra-, teils intraglobuläre Gebilde von ovaler, birnenförmiger, oder mehr länglich stäbchenartiger Gestalt, die manchmal etwas stärker spindelförmig anschwellen. Es sind dies stets scharf begrenzte, hellblau gefärbte Gebilde mit ein bis zwei, gewöhnlich exzentrischen Körnchen. Die größeren Körnchen zeigen eine intensive rote Chromatinfärbung, die kleineren dagegen färben sich mehr in einem dunkleren violetten Ton (Fig. 1—8).

Ein zweiter Typus wird von jenen Formen gebildet, bei denen, nebst dem schmalen, etwas dunkler blaugefärbten Plasmaleib 1—2 größere, stäbchenförmige, intensiv rotgefärbte Chromatinkörner vorhanden sind: manchmal finden sich auch weitere, kleinere, mehr violette Körnchen vor (Fig. 9—12). Weniger häufig fanden sich größere, meist intra- oder extraglobuläre Gebilde, deren Plasma die verschiedensten Schattierungen des Lichtblau bei der Giemsa-Färbung annahm und welche Chromatinkörner verschiedener Größe, sowie mehr oder weniger Pigmentkörner

enthielten. Ihre Form ist teils unregelmäßig dreieckig, teils rund oder oval, ihre Grenzen sind meistens durchaus scharf (Fig. 13—20).

Die solche Gebilde enthaltenden roten Blutkörperchen färben sich mitunter weniger intensiv als die übrigen. Aus der Lagerung einzelner dieser Typen innerhalb einer Ausbuchtung des Erythrocyten läßt sich folgern, daß dieselben unter Umständen aus den roten Blutkörperchen ausgestoßen werden; dies wären wiederum jene Formen, welche in gewisser Hinsicht mehr an die entwickelten Typen der Malariaplasmodien erinnern, obwohl einzelne Autoren (Peruggi) auch bei Piroplasmen ihr Vorkommen annahmen.

Ganz besonders muß hervorgehoben werden, daß die geschilderten Gebilde im allgemeinen sehr wenig zahlreich und, wie bereits betont, bloß in tadellosen Giemsa-Präparaten aufzufinden sind. Mitunter mußten mehrere Präparate genau untersucht werden, bis Gebilde angetroffen wurden, welche die den Protozoen entsprechenden Kriterien, nämlich scharfe Umrandung des blau gefärbten Protoplasmas und rotgefärbte Chromatinkörnchen, besaßen. Ihr Auffinden ist demzufolge vielfach sehr zeitraubend und mühsam; trotzdem gelang es uns, in fast allen von Lebenden stammenden Blutpräparaten ihre Anwesenheit nachzuweisen.

Dem Gesagten nach ist es wohl selbstverständlich, daß bei dem seltenen Vorkommen unserer Gebilde das Studium eventueller Entwicklungsstadien außerordentlich erschwert war. Wir versuchten zwar, ungefähr ein Viertel der Fälle systematisch zu untersuchen, indem wir von ihnen täglich 1—2mal Blut entnahmen und die Fälle über eine Woche lang studierten.

Zu einheitlichen Resultaten konnten wir aber auch auf diese Weise nicht gelangen.

Von dem Gedankengange geleitet, daß die fraglichen Gebilde möglicherweise phagocytiert und irgendwo im Körper zurückgehalten werden, untersuchten wir auch die Endothelzellen der Blutgefäße, sowie die übrigen, zum Teil die Rolle von Phagocyten spielenden Zellen des Körpers. Positive Resultate konnten wir aber auch hier nicht verzeichnen.

Gebilde, welche wir als Protozoen aufzufassen genötigt sind, fanden wir stets nur im Blute, und zwar innerhalb des Kreislaufes, ferner in Ausstrichpräparaten von Milz und Knochenmark. In Schnitten die beiläufig in $\frac{1}{3}$ der Fälle aus den verschiedensten Organen, insbesondere aus dem Knochenmark, der Milz, den Gefäßen hergestellt wurden, konnten wir niemals Gebilde antreffen, die mit Sicherheit den im Blut angetroffenen entsprachen, namentlich deutlich erkennbares Chromatin aufwiesen, trotzdem die für die Färbung von Protozoen empfohlenen verschiedenen Methoden (Giemsa-Färbung, nach Einbettung in Paraffin, die von Hansen modifizierte Färbung mit Eisenhämatoxylinlösung, Borax-methylenblau und polychromes Methylenblau nach der Angabe Unnas) in Anwendung gebracht wurden.

Die wichtigste Frage, die sich uns gleich vom Anfang an aufwarf und über die wir seit Beginn unserer Untersuchungen nachzudenken reichlich Gelegenheit hatten, ist natürlich die, ob die beschriebenen Gebilde auch wirklich Protozoen entsprechen und nicht etwa Kunstprodukte oder sonstige Bestandteile des Blutes und der Erythrocyten darstellen. In Betracht kommen hier vor allem die im Blute oft so zahlreich vor.

kommenden Blutplättchen, die Zerfallsprodukte der weißen Blutkörperchen, weiterhin die als Innenkörper beschriebenen Gebilde, die sogenannten metachromatischen Substanzen der Erythrocyten, und schließlich die bei Giemsa-Färbung fast nie ganz vermeidbaren Farbstoffniederschläge.

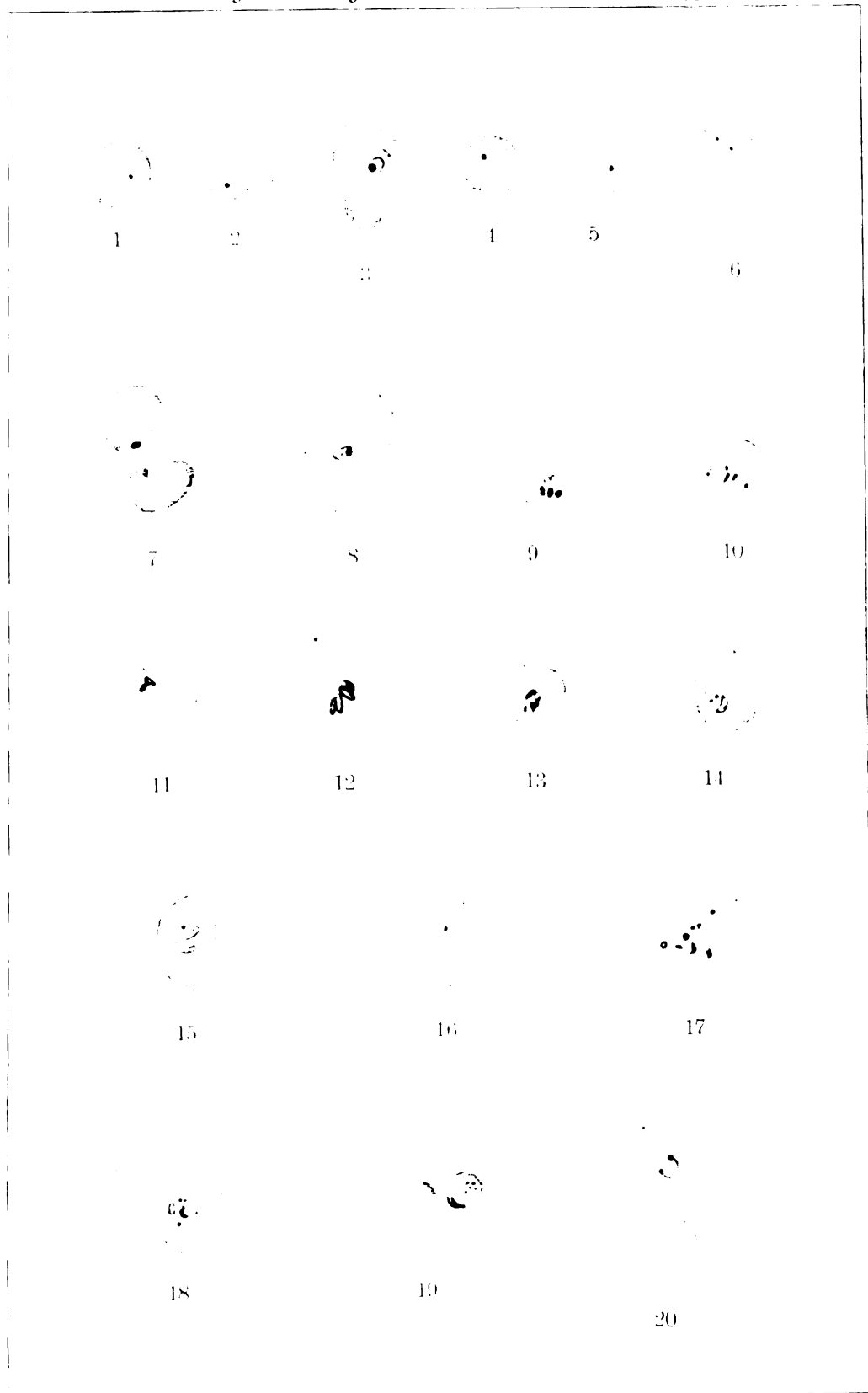
Daß namentlich auch bei septischen Erkrankungen durch Zerfall von Leukocyten entstandene Gebilde durch Erythrocyten häufig aufgenommen werden, davon konnten wir uns besonders an Giemsa-Ausstrichpräparaten überzeugen, welche aus der Milz von an verschiedenen septischen Erkrankungen Verstorbenen vergleichshalber angefertigt wurden.

Hervorzuheben ist, daß hier innerhalb der Erythrocyten vielfach selbst ziemlich scharf begrenzte, hellblau gefärbte Gebilde vorkommen, welche auch ihrer Größe nach an die oben besprochenen Gebilde erinnern, niemals aber waren innerhalb derselben rotgefärbte Chromatinkörner anzutreffen. Da wir nun eben die scharfe Umgrenzung einesteils, sowie die rotgefärbten Chromatinkörner andererseits als Kriterien jener Gebilde hinstellten, und da bei den Blutplättchen, Innenkörpern, metachromatischen Substanzen und Farbstoffniederschlägen, diese Kriterien insgesamt nicht vorhanden sind, sind wir wohl berechtigt, erstere als Protozoen anzusprechen, resp. Kunstprodukte oder sonstige Bestandteile des Blutes auszuschließen.

Uebrigens wird wohl ein jeder, der die dieser Arbeit beiliegenden Abbildungen aufmerksam betrachtet, den wesentlichen Unterschied zwischen diesen Protozoen und den in Frage kommenden Kunstprodukten, sowie sonstigen Gebilden wahrnehmen und sich überzeugen können, daß hier Verwechselungen in dem oben geschilderten Sinne nicht anzunehmen sind. Auch daran dachten wir, ob wir es nicht mit im Körper der Kranken vorhandenen latenten Malaria plasmodien zu tun hätten, doch ließ sich diese Möglichkeit einesteils durch die morphologische Verschiedenheit der Protozoen, andererseits durch das sozusagen ständige Vorkommen derselben im Blute der von uns untersuchten Kranken ablehnen.

Auf die parasitäre Aetiologie des Typhus exanthematicus wurde übrigens schon früher, insbesondere 1903 von Gotschlich hingewiesen, der in Aegypten im Blute von 6 Kranken bei Anwendung der Romanowskyschen Färbung solche Gebilde fand, die teils mit den unserigen übereinstimmenden, teils aber abweichenden Typen auftreten und die er für Protozoen hielt.

Da er aber bloß 6 Fälle untersuchte und darunter bloß einen einzigen vom Anfang bis zum Ende mikroskopisch zu untersuchen Gelegenheit hatte, da er weiterhin mangels Obduktionen die erwähnten Gebilde im Leichenmaterial nicht nachweisen konnte, so äußerte er sich über die ätiologische Bedeutung seiner Befunde nur mit Vorbehalt und betont nachdrücklichst die Notwendigkeit diesbezüglicher eingehender Untersuchung. Da wir demgegenüber die erwähnten Protozoen im Blute unserer zahlreichen Fälle fast stets antrafen, da uns weiterhin deren Nachweis auch in Ausstrichpräparaten von Leichenmaterial (Milz, Knochenmark) gelang und da die Protozoen in tadellosen Giemsa-Präparaten im allgemeinen wohl spärlich, doch fast stets vorhanden sind, werden wir geradezu zu der Annahme gedrängt, diese Protozoen zu der Erkrankung in kausale Beziehung zu bringen.



Krompecher gez.

Verlag von Gustav Fischer in Jena.

Lith. Anst. v. Johannes Arndt, Jena.

Die epidemiologischen Erfahrungen weisen übrigens schon seit lange auffallend auf die Möglichkeit hin, daß bei der Entstehung des Typhus exanthematicus ein Protozoon beteiligt sei, welches durch häusliches Ungeziefer, wie Wanzen, Flöhe, Läuse, verbreitet wird, indem sich auf diese Art jener Umstand am leichtesten erklärt, daß diese Seuche fast ausschließlich unter ungünstigen hygienischen, namentlich schlechten Wohnungsverhältnissen propagiert wird (Kolle-Wassermann, Handbuch der pathogenen Mikroorganismen). Neuestens nehmen auch Yersin und Vassal¹⁾ an der Hand ihrer Erfahrungen bei einer kleinen Epidemie in Anam an, daß die Uebertragung wahrscheinlich durch Insektenbiß geschieht. Auch in dieser Richtung stellten wir Experimente an. Eines-teils ließen wir die an Typhus exanthematicus Erkrankten durch Wanzen stechen und untersuchten das aus denselben ausgepreßte Blut, andererseits untersuchten wir die von den Kranken stammenden Läuse auf Protozoen, jedoch mit negativem Erfolg.

Sowohl in dem Blut der Kranken wie auch im Leichenblut fanden sich in der Mehrzahl der Fälle pathogene Bakterien, namentlich Strepto-, Staphylokokken, Bacillus Friedländer, sowie ein schon anlässlich der Prager Epidemie vom Jahre 1888 von Hlava als *Leuconostoc hominis* beschriebener *Diplostreptococcus*.

In Anbetracht dessen, daß die letal verlaufenden Fälle am Obduktionstisch das ausgesprochene Bild einer hämorrhagischen Sepsis bieten, ergibt sich begreiflicherweise die Frage, inwiefern diese Bakterien neben den Protozoen beteiligt sind. Es ist nicht unmöglich, und unsere bakteriologischen Untersuchungen sprechen mit gewisser Wahrscheinlichkeit auch dafür, daß bei manchen Fällen neben den ätiologisch verantwortlichen Protozoen auch den erwähnten Bakterien eine gewisse Rolle zukommt. Möglicherweise ist durch das Eindringen der Protozoen und die dadurch verursachte Infektion des Organismus, eine Herabsetzung der Widerstandskraft desselben, ein *locus minoris resistentiae* gegeben, wobei den wiederum eher auf unreinlichen, unhygienisch lebenden Individuen haftenden Bakterien Gelegenheit zum Ueberhandnehmen und zur Aggravierung des Krankheitsbildes geboten wird.

1) Yersin und Vassal, Centralbl. für allgemeine Pathologie. Bd. XX. No. 6. p. 265. Ref.

Nachdruck verboten.

Deux bothriocéphales monstrueux.

Par le Dr. N. Leon, Professeur à l'Université de Jassy.

Avec 2 figures.

Les deux bothriocéphales ont été évacués ensemble par la même personne, C. B. Ils ont été apportés à mon laboratoire par l'étudiant Busac, interne à l'hôpital Pascanu de Jassy. Le Dr. Balaceanu, médecin de l'hôpital et qui a soigné le malade, a eu l'amabilité de nous communiquer l'observation suivante:

«C. B., âgé de 49 ans, de constitution forte, je pourrais même dire inclinant vers l'obésité s'il ne suivait un régime alimentaire convenable arthritique invétéré; il n'a souffert cependant que d'un eczéma fort tenace de la face et des mains et de douleurs rhumatismales. Il a six enfants, tous bien portants. Des médicaments mercuriels, il nous dit qu'il en a pris il y a une trentaine d'années. Son alimentation journalière se compose de poissons, comme la carpe, le carassin, le brochet, le poisson salé, et la viande de porc.

Au commencement de Décembre 1908, le malade, qui est venu me consulter, se plaint d'étourdissements, de palpitations, de douleurs abdominales et de salivations et quoiqu'il ne fût ni anémique ni ne présentât cette cachexie caractéristique bothriocéphalique ces symptômes cependant que je ne pouvais rattacher à une lésion organique me font penser aux vers intestinaux et je lui prescris un gramme Tanat de pelletière. En effet l'événement justifie la supposition car le malade expulse un morceau de bothriocéphale. Dans le courant de Janvier les étourdissements et les palpitations le troublant de plus en plus, car, s'ils ne duraient qu'un clin d'œil, ils se répétaient toutes les trois ou quatre minutes, je me décidai, quoique ce ne fût pas indiqué, à lui prescrire un nouveau vermifuge et cette fois je remplace la pelletière par:

Pulv. Koussou	8 g
extraits filicis mas	4 "
à partager en 12 bols	

et je recommande qu'il en prenne une toutes les dix minutes avec une gorgée de thé avec du rhum après chacune et une heure après la dernière bol

Aq. laxativa viennoise	130 g
sirop manat	30 "

Il va sans dire que vingt-quatre heures avant qu'il prit le médicament je lui avais recommandé un certain régime et à savoir de ne manger que des aliments salés c'est-à-dire des harengs, des olives, des oignons et de l'ail.»

Les deux bothriocéphales sont intéressants à cause des multiples anomalies qu'ils présentent comme couleur et comme forme.

1) Comme couleur tous les deux sont gris ardoisé. L'un est long de quatre à cinq mètres et présente aussi la tête; la tête manque au deuxième qui n'est long que de trois mètres. Après la conservation dans l'alcool à 70% la coloration s'est atténuée tout en restant distincte. Mais les segments montés dans le baume de Canada après avoir été

dans l'alcool absolu et passés ensuite par le toluol, gardent leur couleur ardoisée.

Quand nous comparons nos exemplaires, en ce qui concerne la coloration, avec les ténias noirs décrits par les auteurs nous constatons que nous avons devant nous un cas particulier de coloration parce que dans nos spécimens on n'observe pas de pigments. La coloration gris ardoisé de notre cas est due à une substance diffuse qui colore d'une façon plus intensive la cuticule et la sous-cuticule, plus faiblement les glandes vitellogènes. et pas du tout le parenchyme avec les autres organes internes qui y sont situés, comme on peut le voir par les sections transversales.

Les deux cestodes font l'impression d'avoir été trempés dans une substance colorante de sorte que le cas ressemble parfaitement avec ceux qui ont été décrits par R. Blanchard (2) p. 9.

«Je possède un *Taenia saginata* long de 3 à 4 mètres et de dimensions absolument normales. Sa couleur est singulière: il est noir ou plutôt gris ardoisé, mais cette teinte peut beaucoup varier d'intensité d'un anneau à l'autre et même sur un même anneau; elle est plus marquée dans les plis ou les dépressions. Bien plus, certains anneaux sont colorés à l'une de leurs faces, tandis que l'autre face est restée toute blanche, comme si elle s'était trouvée en contact avec une surface quelconque, par exemple avec un autre anneau, au moment précis où une substance colorante est venue agir sur le ver.»

Si le malade ne nous avait pas déclaré que depuis trente ans il n'avait pas pris de médicaments mercuriels, nous aurions attribué la coloration dans le cas présent à ces substances médicamenteuses comme dans le cas d'Oelkers, mais il est probable qu'elle est due aux matières colorantes de la bile comme dans le cas de Nabias.

2) Bien plus intéressantes et plus curieuses sont les anomalies morphologiques et surtout celles que présente le spécimen avec la tête. Si nous en exceptons environ 45 centimètres à partir de la tête, le reste est, avec de petites interruptions, entièrement monstrueux (fig. 1).

Indépendamment des anomalies communes comme anneaux surnuméraires c'est-à-dire anneaux triangulaires situés à la façon d'un coin et segmentés avec des divisions incomplètes, le parasite présente une espèce d'excroissances irrégulières et une espèce d'écailles situées à la surface du corps, tantôt sur la partie ventrale des anneaux, tantôt sur la partie dorsale, tantôt sur les bords.

Il y a des portions du strobile où ces excroissances se retrouvent des trois côtés de l'anneau. Il en est de même des plis, autant les normaux qui séparent complètement les anneaux les uns des autres que les anormaux qui les séparent d'une manière incomplète. Ils prennent un développement plus grand que les plis des bothriocéphales normaux. Ils sont ondulés de sorte qu'avec ces excroissances ils donnent aux anneaux sur lesquels elles sont entassées l'aspect de la surface externe du corps de fructification de la morille.

Certaines de ces excroissances ont la forme de cônes courts avec base circulaire fixée à l'anneau et le sommet libre. Certaines d'entre elles, les plus grandes, sont couvertes à la surface de nombreuses petites papilles cuticulaires. Les écailles sont une espèce de disques oblongs irréguliers fixés à l'anneau par un pédicelle très court.

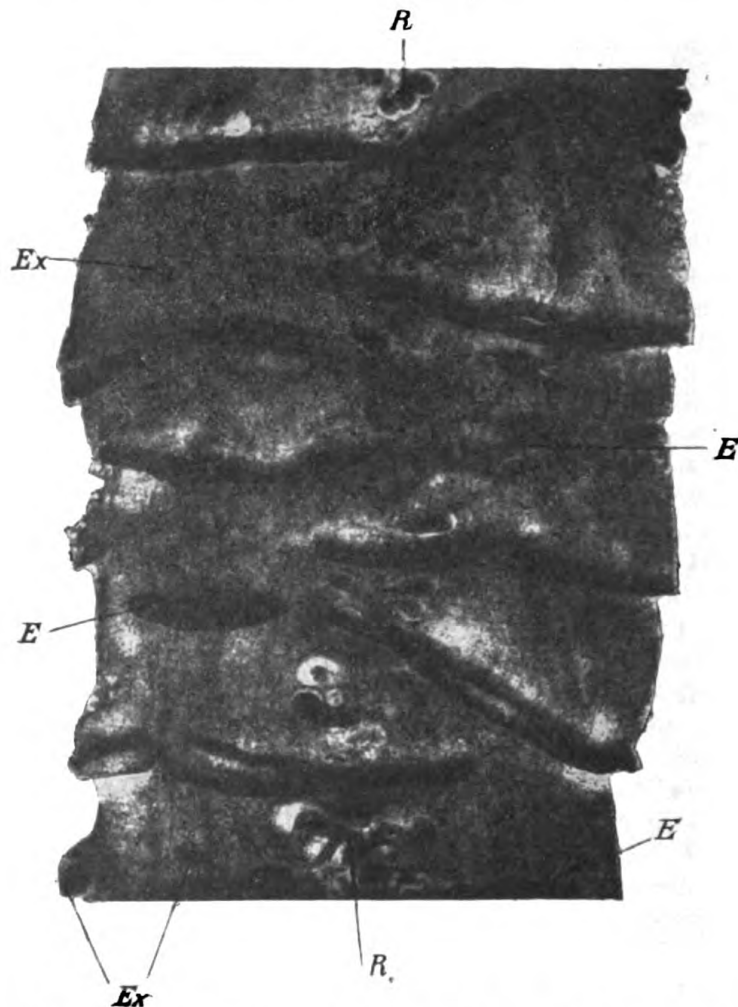


Fig. 1. Fragment de la chaîne 'monstrueuse' du *Bothriocephalus latus*. *E* Écaille; *Ex* excroissances; *R* la rosette utérine.

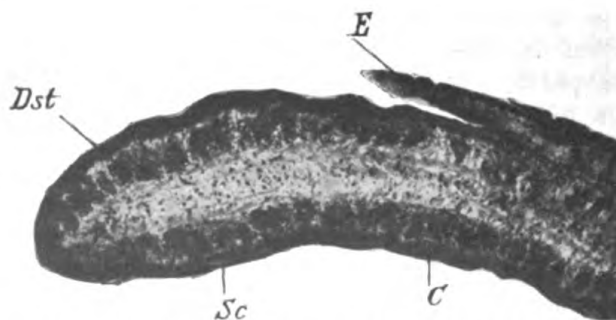


Fig. 2. Coupe transversale d'un anneau du *Bothriocephalus* passant par l'écaille (*E*). *C* cuticule; *Sc* couche sous-cuticulaire; *Dst* vitellogène.

Les excroissances irrégulières de même que les écailles ne sont pas seulement des productions cuticulaires comme cela semblerait; elles ont une constitution histologique bien déterminée.

Les écailles (fig. 2) se forment par l'évagination de la cuticule avec la sous-cuticule, qui forment d'abord un bouton; ce bouton croît, se développe et prend la

forme d'un disque attaché à l'anneau par un pédicelle très court.

Une section transversale faite dans un semblable pédicelle nous montre qu'il présente un lumen.

Il paraît que cette multiplication prodigieuse des anneaux est une tendance de l'animal à la multiplication des organes de reproduction. Comme nous l'avons déjà montré dans d'autres occasions le bothriocéphale est un cestode très répandu chez nous en Roumanie (3 et 4). On sait que les agents d'infection de ce cestode sont les poissons: *Esox lucius*, *Trutta fario*, *Lotta vulgaris* et *Thymallus vulgaris*. Les larves s'en trouvent de préférence dans la chair, le foie, les parois de l'intestin, de l'estomac, et dans l'ovaire.

Nous n'avons donc pas à nous étonner de la fréquence du bothriocéphale chez nous.

«La Roumanie est un des pays les plus riches en eaux douces de l'Europe. D'après les calculs qui ont été faits la surface totale de nos eaux intérieures est évaluée approximativement à 817 000 hectares, donc 6,14% de la surface totale du pays. Ces eaux, par rapport à leur position géographique, présentant une grande variété de conditions physiques: d'un côté nous avons le Danube avec ses bouches et une multitude de marais et de lacs qu'il forme par ses débordements périodiques, d'un autre la multitude de ruisseaux et de rivières qui serpentent à travers nos montagnes et se réunissent à mesure qu'ils avancent pour se verser tous dans le Danube. Il y a ensuite la série des lacs et des lagunes d'eau douce ou saumâtre le long de nos côtes sur la Mer Noire et enfin une quantité de lacs naturels et d'étangs artificiels dans l'intérieur du pays. Toutes ces eaux nourrissent dans leur sein une grande variété et une immensité de poissons et nos pêcheries sont arrivées à être comptées dans le monde entier parmi les plus grandes pêcheries d'eau douce de l'Europe» (1).

La base de la nourriture de notre population est le poisson. La partie du poisson qui contribue directement chez nous à la propagation de ce cestode, ce sont les œufs, à cause de l'habitude que l'on a de les manger crus, sous le nom de caviar, préparés avec un peu de jus de citron et d'huile d'olive, ce qui, il est vrai, constitue un manger délicieux.

Mais ce qui nous étonne, ce sont les cas extraordinairement rares d'anémie bothriocéphalique vis-à-vis du nombre colossal des bothriocéphales.

Dans les cas présent M. C. B. chez qui ces deux bothriocéphales se sont développés, est une personne robuste et bien portante.

Littérature.

- 1) Antipa, Gr., Fauna ichtiologica a Romanici. Bucuresti (Carol Göbl) 1909.
- 2) Blanchard, Raphael, Sur quelques Cestodes monstrueux. (Publication du Progrès médical. Paris 1894.)
- 3) Leon, N., Note sur la fréquence des bothriocéphales en Roumanie. (Bull. de la soc. d. scienc. de Bucarest. T. XIII. 1904. p. 286.)
- 4) —, Contribution à l'étude des parasites animaux de Roumanie. (Bull. des méd. et naturalistes. Jassy 1908.)

Nachdruck verboten.

Ueber die Sterilisierung des Catguts¹⁾.

[Aus dem Institut für Hygiene der Kgl. Universität zu Parma
(Vorstand: Prof. E. Bertarelli).]

Erste Mitteilung.

Von Prof. E. Bertarelli und Dr. J. Bocchia.

Die Frage, ob es möglich ist, das Catgut vollständig zu sterilisieren, ohne die charakteristischen Eigenschaften dieses Materials (Widerstandsfähigkeit, Elastizität, die Fähigkeit, sich leicht zu disgregieren und resorbiert zu werden usw.) zu zerstören, wird von Zeit zu Zeit aufgeworfen. Wie es bei vielen menschlichen Dingen zu gehen pflegt, hat das Catgut seine Anhänger und seine Gegner. Auch unter den Chirurgen gibt es solche, die auf dieses Material unbedingt nicht verzichten zu können glauben, wie auf der anderen Seite auch solche nicht fehlen, die es bequem finden, die wirkliche Sterilisierbarkeit dieses Materials in Zweifel zu ziehen und ihm alle Schuld beimessen, wenn ein Fall chirurgischer Infektion vorkommt. Wenn man nach den mündlichen Äußerungen mancher Aerzte urteilen wollte, welche das Catgut a priori für fehlerhaft halten, aber trotzdem auf seine Verwendung nicht verzichten, so könnte man fast auf den Verdacht kommen, als ob die Verallgemeinerung dieser Anklagen manchmal dazu dienen sollte, sich zum voraus eine Art von Alibi zu sichern für die (glücklicherweise sehr seltenen) Fälle von Infektion durch die Operationswunden.

Im Jahre 1907 wurden einige dieser Anklagen besonders lebhaft erhoben, und man argwöhnte nicht nur, daß im Catgut die Ursache einiger Fälle von Tetanus zu suchen sei, sondern auch, daß man sich im allgemeinen auf dieses Material und seine aseptische Präparation durchaus nicht verlassen könne.

Es ist auch eine wissenschaftliche Arbeit erschienen, welche eine Erklärung für die Tatsache, daß das Catgut Tetanus verursachen könne, darin zu finden glaubte, daß für die Herstellung des käuflichen Catguts manchmal nicht die Eingeweide von Hammeln und jungen Ziegen verwendet werden, sondern solche von Pferden. Und daß das tatsächlich zuweilen der Fall ist, wurde durch direkte Versuche an gewissen Sorten von Catgut mit präzipitierendem Immunsérum erwiesen.

Aus dieser Veranlassung wurde der eine von uns von einem bekannten Fabrikanten antiseptischer Erzeugnisse für Wundbehandlung gebeten, die ganze Frage des Catguts nach allen Seiten zu untersuchen, nicht nur um festzustellen, ob die von diesem Fabrikanten benutzten Methoden mehr oder weniger empfehlenswert seien, sondern vor allem, um im allgemeinen ein Urteil darüber zu gewinnen, ob das Catgut einer Behandlung unterzogen werden könne, welche a priori seine Sterilität gewährleiste, und ferner, um zu sehen, welche von den vielen zu seiner Herstellung empfohlenen Methoden als wirklich gut angesehen zu werden verdienen.

1) Ins Deutsche übertragen von Dr. med. K. Rühl, Turin.

Wir werden uns deshalb jeglicher Polemik absichtlich enthalten. Es ist unmöglich, objektiv festzustellen, ob die im Jahre 1907 gegen das Catgut erhobenen Klagen Glauben verdienen oder nicht; zum mindesten müßte man die Fälle von Tetanus oder anderen Infektionen, deren Ursache dem Catgut zugeschrieben wird, genau in ihrem Verlauf verfolgt haben, um sich ein Urteil darüber zu bilden, ob die Anklagen berechtigt sind, oder ob nicht vielmehr andere Ursachen zur Erklärung der stattgehabten Infektion heranzuziehen sind.

Auch die Untersuchung vieler Muster von Catgut verschiedener Herkunft und Herstellungsart hat in unserem Fall keinen großen Wert. Es ist einleuchtend, daß eine solche Untersuchung nur Wert haben kann für einzelne untersuchte Muster, daß sie uns aber wenig Auskunft gibt über die Zuverlässigkeit der benutzten Herstellungsmethode und darüber, ob die nach ihr hergestellten Materialien auch immer mit Sicherheit steril sind.

Ueber die Möglichkeit, ob zur Bereitung des Catguts minderwertige Materialien (Pferdedärme) angewendet werden können, für welche jedenfalls die Garantie einer guten sterilisierenden Behandlung eine geringere sein würde, werden wir nicht viele Worte verlieren. Indem wir die praktische Frage, ob wirklich in der Industrie solche minderwertige Materialien zur Verwendung kommen (was die Techniker für absolut ausgeschlossen erklären, da diese Eingeweide wegen ihrer Dicke wohl zur Herstellung von Darmsaiten dienen könnten, aber nicht zur Bereitung eines auch nur mittelmäßigen Catguts), ganz außer Betracht lassen, glauben wir, daß nur eine solche Methode, das Catgut zu behandeln, als gut angesehen werden kann, welche imstande ist, das Eingeweide völlig steril zu machen, auch wenn dieses vorher irgendwelche schwere Infektion erlitten hat.

Um in der hier folgenden Abhandlung völlig objektiv zu bleiben, werden wir die von den Fabrikanten, welche uns zu dieser Studie veranlaßt haben, befolgte Methode ganz außer Betracht lassen, und erwähnen nur, daß sie sich zweien von den Prozessen, die wir beschreiben werden, einigermaßen nähert, jedoch mit einigen Komplikationen im Verfahren, welche angezeigt erschienen, um die völlige Asepsis besser sicherzustellen. Wir werden nur die Resultate dieser Methode mitteilen: natürlich unter unserer Verantwortlichkeit und ohne anderen irgend eine Meinung aufdrängen zu wollen, da wir die Herstellungsmethode nicht veröffentlichen dürfen.

* *

Das Catgut (ein englisches Wort, welches etymologisch sich nur auf Katzendärme beziehen würde) wird industriell unter Verwendung der Eingeweide von Schafen und jungen Ziegen erzeugt. Aus diesem Grunde findet sich das Rohmaterial am reichlichsten in den Ländern, in denen viel Hammelfleisch gegessen wird (Frankreich, Schweiz, Deutschland).

Daß auch die Eingeweide großer Tiere hin und wieder Verwendung finden können, wollen wir nicht ausschließen: wer jedoch die Verhältnisse der Industrie kennt und die Technik der ersten Verarbeitung dieses Materials, wird nicht recht einsehen, warum man solche Eingeweide verwenden sollte, welche eine größere Arbeit in der ersten Vorbehandlung nötig machen, wodurch der geringe pekuniäre Nutzen, der aus der Verwendung von Pferdedärmen erwachsen könnte, stark vermindert oder ganz

aufgehoben wird. In großen Zügen läßt sich die Fabrikation des Catguts in folgender Weise resumieren: Nachdem die Eingeweide oberflächlich gewaschen, von den Faeces und dem anhängenden Schleim befreit sind, werden sie gründlich gesalzen, um sie vor dem Verderben zu schützen, dann in besonderen Räumen aufgeweicht und entfettet, um sie gut verarbeiten zu können, und schließlich der Länge nach aufgeschnitten. Nachdem sie so geöffnet sind, werden sie sorgfältig geschabt, um die Schleimhaut und die seröse Haut vollständig zu entfernen, so daß nur die Muskelhaut übrig bleibt. Das zukünftige Catgut besteht demnach ausschließlich aus Muskel- und Bindegewebsfasern. Meistens werden nach dem Schaben die Eingeweide, die sich dann als dünne Blätter präsentieren, in zwei oder mehr Streifen zerschnitten, immer parallel zur Längsachse des Darmes. Nur selten wird ein Darm, um die größten Sorten Catgut daraus zu machen, nach dem Aufschlitzen und Schaben im ganzen verwendet, ohne ihn vorher in zwei oder mehr Streifen zu schneiden.

Wir haben diesen größeren Teil der Vorbereitung beschrieben, um zu zeigen, daß die Verdächtigung, es seien Pferdedärme zur Herstellung des Materials verwendet worden, die im Jahre 1907 von einigen Autoren gegen das Catgut ausgesprochen wurde, unseres Erachtens praktisch nur von geringer Bedeutung ist.

In der Tat — abgesehen davon, daß Tetanussporen sich sowohl in den Eingeweiden von Pferden als auch in solchen von Schafen befinden — für jeden, der die Verarbeitung des Catgut kennt, ist es ohne weiteres klar, daß das Abschaben, durch welches die Schleimhaut und die seröse Haut vollständig entfernt werden, und die chemische und physikalische Behandlung, der das Catgut in seiner Verarbeitung unterworfen wird, Maßregeln von solcher Art sind, daß wirklich nicht einzusehen ist, weshalb die Eingeweide von Pferden, wenn solche wirklich verwendet werden, eine größere Gefahr herbeiführen sollten als die von Schafen und jungen Ziegen: immer davon ausgehend, daß in beiden Sorten von Eingeweiden die Gegenwart von Tetanussporen und die daraus entspringende Gefahr als möglich angenommen werden muß.

Im weiteren Verlauf der Verarbeitung wird die in Streifen geschnittene Muskelhaut des Eingeweides in alkalischen Lösungen (Kalklauge und Holzasche) mazeriert, wobei zuerst schwächere, dann immer konzentriertere Lösungen angewendet werden, und dann sorgfältig gewaschen. Hierauf erleidet das Häutchen in manchen Fällen eine erste Behandlung mit Sublimat mit nachfolgender Entfernung des Quecksilbers durch ein geeignetes Reagens, wird darauf getrocknet und zu einer Schnur zusammengedreht. Es geht hieraus hervor, daß bei gut geleiteter Operation die größeren Sorten Catgut nicht aus dickeren Eingeweiden, sondern durch Zusammendrehung einer größeren Anzahl von Hautstreifen erzielt werden.

Die so hergestellte Schnur wird durch Behandlung mit Schwefelsäureanhydrid gebleicht, durch mechanisches Abreiben mit feinem Glaspulver gereinigt und mit Oel eingerieben, um sie zu konservieren und geschmeidig zu machen. Nach dieser Behandlungsweise ist das rohe Catgut fertig.

Es ist einleuchtend, daß das so erzeugte Catgut, obwohl es nur noch einen kleinen Teil des Eingeweides darstellt, von welchem zu Anfang ausgegangen wurde, und obwohl es demgemäß sehr viel weniger infiziert sein muß, als das ursprüngliche ganze Eingeweide, noch weit

davon entfernt ist, als völlig keimfrei betrachtet werden zu können, und daß man berechtigt ist, a priori darin noch das Vorhandensein lebensfähiger Keime von Tetanus, Subtilis und anderen Krankheitserregern vorauszusetzen. Mancher Fabrikant, welcher das Rohcatgut lediglich zu dem Zwecke herstellt, um daraus nachher Catgut zur chirurgischen Verwendung zu erzielen, unterwirft es im Laufe der Verarbeitung noch anderen Behandlungsweisen. Wir haben oben schon die mit Sublimat erwähnt, doch sind auch noch andere Methoden im Gebrauch.

Das zu chirurgischen Zwecken bestimmte Catgut muß noch einer Behandlung unterworfen werden, welche seine völlige Sterilisation sicherstellt. Die Schwierigkeiten, um deren Ueberwindung es sich hierbei handelt, sind folgende:

- 1) Im Catgut können sich, trotz der beschriebenen vorbereitenden Behandlung, noch äußerst widerstandsfähige Krankheitskeime befinden.
- 2) Das Catgut ist ein organisches Material, welches einige sehr bequeme physikalische Sterilisierungsmethoden nur sehr schlecht verträgt (strömender Wasserdampf, oder Wasserdampf unter höherem Druck).
- 3) Im Catgut befindet sich immer Fett in größerer oder geringerer Menge, welches durch die vorbereitende Behandlung nicht völlig entfernt wurde und welches die Wirkung der Desinfektionsmittel auf die vegetativen Bakterienformen und auf die Sporen beeinträchtigt.
- 4) Die Sterilisierungsmittel können sehr leicht die Festigkeit und Elastizität des Catguts beschädigen und dadurch seine praktischen Vorzüge in Frage stellen.

Eine gute Sterilisierungsmethode ist nur die, welche bei voller Sicherheit für die Keimfreiheit die Festigkeit und Geschmeidigkeit der Fäden nicht verändert.

Um die Sterilisierung zu erleichtern und um ein Material zu erhalten, welches in den Geweben des menschlichen Körpers leicht resorbiert wird, ist es unter allen Umständen nötig, das Catgut vorher zu entfetten. Die Entfettung kann entweder durch Behandlung des Materials mit Aether in einem Extraktionsapparat mit Rückflußkühler ausgeführt werden, oder auch, wie es bei anderen Fabrikanten geschieht, dadurch, daß man das Catgut 24—48 Stunden unter Schwefeläther, der zweimal erneuert wird, aufbewahrt. Nach der Entfettung, aber vor der Sterilisation, wird das Catgut auf Spulen gewickelt. Diese Aufwicklung erschwert, wie leicht einzusehen, die Einwirkung der Desinfektionsmittel auf die Schichten des Fadens, die unmittelbar die Glasspule berühren. Um dieser Schwierigkeit zu begegnen, haben einige Fabrikanten die Form der Spulen in der Weise abgeändert, daß sie nicht mehr einen kreisrunden Querschnitt haben, sondern einen viereckigen mit konkaven Seitenflächen. Da auf diese Weise die Berührung des Catguts mit der Oberfläche der Spule auf wenige Punkte beschränkt ist, so wird die Einwirkung des Desinfektionsmittels auch auf die innersten Schichten des Catguts beträchtlich erleichtert.

Wir sind indessen der Meinung, daß diese Einrichtung in der Praxis keine große Bedeutung haben kann, und daß ein gutes Desinfektionsmittel auch ohne solche Kunstgriffe so leicht in das Catgut eindringen muß, daß die Sterilität ohne weiteres immer sichergestellt erscheint. Wir heben noch hervor, daß auch bei den feinsten Nummern des Catgut sich selten mehr als zwei oder drei Wickelschichten übereinander befinden werden, und daß daher die Durchdringung auch bis zur innersten Schicht immer leicht vor sich gehen wird.

In einigen deutschen Krankenhäusern hat man die gleichförmige Sterilisierung des Catguts dadurch zu erleichtern gesucht, daß man es nicht auf Spulen aufwickelte, sondern Glasspatel von 15—20 cm Länge benutzte, mit großen Durchbohrungen in der Nähe der beiden Enden, durch welche die in passende Längen geschnittenen Catgutfäden hindurchgezogen und darin befestigt wurden, so daß man also einzelne Schlingen von Catgut hatte. Das Ganze wurde dann nach der Sterilisierung in passenden Gefäßen, die mit desinfizierenden und konservierenden Flüssigkeiten gefüllt waren, aufbewahrt.

Uebrigens hat man bei einigen der Methoden, welche wir erwähnen werden, besonders bei denen, welche auf der Erhitzung unter Alkohol beruhen, auf das Aufwickeln auf Spulen verzichtet und bewahrt den spiralförmig gewundenen Catgutfaden ohne weiteres in der sterilisierenden und konservierenden Flüssigkeit auf; oder man verwahrt auch (wie es bei unserer Militärverwaltung der Fall zu sein scheint) das spiralgewundene Catgut trocken in Glasröhren, die vor der Lampe zugeschmolzen sind.

Die zur Sterilisierung des Catgut vorgeschlagenen Methoden sind zahlreich, von denen einige sich ausschließlich auf physikalische, andere auf chemische Prozesse stützen, noch andere endlich gleichzeitig die physikalische und die chemische Behandlung anwenden. Einige dieser Methoden sind seit langer Zeit in Anwendung, andere erst seit den letzten 2 Jahren vorgeschlagen worden. Einige derselben sind a priori zu verwerfen.

Wir beabsichtigen nicht, über alle Methoden, die zur Sterilisierung des Catguts vorgeschlagen worden sind, zu berichten, und ebensowenig haben wir alle Methoden, die zu unserer Kenntnis kamen, experimentell untersucht. Wir beschränken uns darauf, die bekanntesten oder die neuesten aufzuführen und werden die Versuche beschreiben, die wir mit denjenigen Methoden angestellt haben, welche entweder a priori oder aus Gründen der praktischen Ausführbarkeit oder wegen aprioristischer theoretischer Erwägungen Beachtung zu verdienen schienen.

Physikalische und chemisch-physikalische Methoden zur Sterilisation des Catguts.

Behandlung mit trockener Wärme. Eine mäßige trockene Wärme, auch wenn sie mehrere Stunden einwirkt, verändert das Catgut nicht merklich in seinen charakteristischen Eigenschaften. Erst bei etwa 120° C beginnen leichte Schrumpfungerscheinungen aufzutreten, und zwar in ausgesprochenerer Weise bei den feinen Catgutfäden als bei den gröberen Sorten. Um aber die Sporen sicher abzutöten, müßte die trockene Wärme praktisch auf mindestens 140—150° gebracht werden.

Reverdin empfiehlt auch, das Catgut eine Stunde lang bei 140° zu behandeln.

Krivoscheine, den Angaben Grouzdevs folgend, versichert, durch Behandlung bei 150° C ein gutes Resultat erzielt zu haben. Laroquette hat das Catgut trocken bei 140° C im Oelbade sterilisiert und behauptet ebenfalls, gute Resultate erhalten zu haben.

Wir haben keine Versuche mit Temperaturen über 120° C gemacht, nachdem wir festgestellt hatten, daß man oberhalb dieser Grenze nicht mehr auf eine völlige Konservierung der guten Eigenschaften des Catguts rechnen kann.

Bei unseren Versuchen mit trockener Hitze haben wir die Catgut-fäden $2\frac{1}{2}$ Stunden lang auf 120° C erhitzt.

Behandlung mit Alkohol bei 120° . Repin ist der erste gewesen, der die Sterilisation des Catguts mit Alkohol bei 120° vorgeschlagen hat. Er schloß das Catgut mit Alkohol in starke Gefäße ein, die er eine Stunde lang im Autoklaven auf 120° erhitzte. Seine Methode ist in verschiedener Weise abgeändert worden, besonders von Triollet, welcher mit Recht auf die Notwendigkeit hinwies, absoluten Alkohol anzuwenden, um die Erweichung und Zerstörung des Catguts zu vermeiden. Dem Verfahren von Triollet und Repin ähnlich ist die Methode von Leguen. Dieser Autor sterilisiert das Catgut in besonderen Röhren mit Alkohol von 90° . Zu diesem Zweck bringt er in das Rohr, welches das Catgut und absoluten Alkohol enthält, ein kleines verschlossenes Glasgefäß mit Wasser. Das Catgut wird in dem absoluten Alkohol eine angemessene Zeitlang auf 120° erhitzt: Wenn man dann das Rohr schüttelt, so zerbricht das Glasgefäß und das darin enthaltene Wasser vermischt sich mit dem Alkohol, welcher dadurch auf die Stärke von 90° gebracht wird (selbstverständlich muß die Menge des Wassers genau im richtigen Verhältnis zur Menge des absoluten Alkohols abgemessen werden, um letzteren auf den genannten Gehalt zu bringen).

Prozeß Robert und Lescurre.

Dieser Prozeß unterscheidet sich nicht wesentlich von dem Prozeß Leguen, abgesehen von einigen Abänderungen in der Technik, den absoluten Alkohol in solchen von 90° umzuwandeln.

Prozeß Barthe und Soulard.

Diese beiden Autoren haben die Methode von Repin abgeändert, wie es scheint, mit gutem Erfolg. Sie wickeln den Faden in Längen von $2\frac{1}{2}$ —3 cm um Glasröhren von 7 cm Länge bei 12 mm Durchmesser. Das Catgut wird zuerst in einem trockenen Luftstrom von nicht über 100° C getrocknet, dann in ein mit Watte verschlossenes Rohr gebracht und in den Dämpfen von wasserfreiem Alkohol eine Stunde lang bei 120° sterilisiert. Wie schon bei der Methode von Repin, wird auch hier die Sterilisation in einem kleinem Autoklaven vorgenommen, der sich in einem größeren befindet. In den kleineren bringt man den Alkohol und das zu sterilisierende Catgut.

Methode von Triollet.

Wir haben schon die Methoden erwähnt, die von diesem Autor vorgeschlagen wurden. Er bedient sich einer besonderen Einrichtung und verwendet als zu erhitzende Flüssigkeit das Aceton. Die Sterilisation wird bei 120° ausgeführt in 40 Minuten.

Bezüglich der Details dieser und der vorhergehenden Methoden verweisen wir auf das bekannte Werk von Gerard (E. Gerard, *Technique de stérilisation*. Paris 1906.)

Methode Guerbet.

Dieser Autor hat die Benutzung von Chloroformdämpfen bei 140° empfohlen. Er bedient sich einer besonderen Einrichtung und schließt

die Spulen mit dem Catgut in Glasröhren ein, die vor der Lampe zugeschmolzen sind.

Methode von Krönig.

Krönig empfiehlt die Sterilisierung des Catguts in Cumol, einem Kohlenwasserstoff, der zwischen 168 und 170° siedet. Das aufgewickelte Catgut wird zuerst trocken auf 70° erhitzt, dann in die mit Cumol beschickten Gefäße getan und auf dem Sandbade erhitzt. Wenn das Thermometer im Cumol eine Temperatur von 155° anzeigt, wird die Flamme unter dem Sandbade ausgelöscht und das Ganze der freiwilligen Erkaltung überlassen. Nach der Sterilisation wird das Catgut mit Petroläther behandelt, um das Cumol zu entfernen, und unter Alkohol, der 1-prom. Sublimat und 1-proz. wasserfreies Glycerin enthält, aufbewahrt.

Methode von L. Mencièrè.

Dieser Autor entfettet das Catgut, erwärmt es auf 100°, wickelt es auf Spulen und bringt es in absoluten Alkohol in Röhren, die vor der Lampe zugeschmolzen werden. Diese Röhren werden im Autoklaven eine Stunde lang auf 120° erhitzt.

Methode Baldy und Martin.

Unterscheidet sich nicht wesentlich von den anderen Methoden mit Alkoholbehandlung. Die Erhitzung geschieht bei 125°.

Methode Grimbert

(Methode der neuen französischen Pharmakopöe).

Bei dieser Methode verfährt man folgendermaßen: Das Catgut wird mit Aether entfettet und 10 Stunden lang bei 85° getrocknet, worauf man es im Exsikkator über Schwefelsäure sich abkühlen läßt. Man bringt es dann in Röhren mit absolutem Alkohol. Die Röhren werden vor der Gebläseflamme zugeschmolzen und 45 Minuten lang im Autoklaven auf 120° erhitzt.

Methode von Frederich.

Frederich hält das Catgut, nachdem es entfettet ist, je nach der Dicke des Fadens 1—5 Stunden lang in einer 5-proz. Formollösung. wäscht es mit sterilisiertem Wasser und bringt es schließlich eine Viertelstunde lang in siedendes Wasser.

Methode Debuchy.

Er entfettet das Catgut mit Schwefelkohlenstoff, legt es 14 Tage lang in eine 2-proz. Lösung von Silbernitrat, wäscht es andauernd mit einer Chlornatriumlösung bis zur völligen Entfernung jeder Spur von Silber, und sterilisiert es durch fraktioniertes Erhitzen auf 80°, jedesmal 1 Stunde lang an 7 aufeinanderfolgenden Tagen.

* * *

Aus den mitgeteilten summarischen Daten ersieht man, daß die meisten dieser Methoden sich außerordentlich ähnlich sind; wir haben deshalb zu unseren Versuchen drei Methoden ausgewählt, die man als typisch betrachten kann:

1) Einfaches Erhitzen in trockenem Zustande auf 120°, 2 Stunden und mehr, ohne nachfolgende andere Behandlung.

2) Behandlung mit Alkohol bei 120° im Autoklaven.

[Wir haben die Methode Grimbart gewählt (neue französische Pharmakopöe), d. h. Behandlung der Fäden in vor der Gebläseflamme zugeschmolzenen, mit absolutem Alkohol gefüllten Röhren, und einstündiges Erhitzen derselben auf 120°.]

3) Methode von Frederich.

Behandlung mit einer 5-proz. Formollösung 1—5 Stunden lang, je nach der Dicke des Catguts, darauf Waschen mit Wasser, und schließlich $\frac{1}{4}$ Stunde in kochendem Wasser.

* * *

Bezüglich der angewendeten Technik erwähnen wir folgendes: Wir haben zunächst Versuche angestellt mit rohem künstlichen Catgut, welches wir vorher mit Aether entfetteten. In einer zweiten Serie haben wir Catgut verwendet, welches bereits einer vorläufigen Behandlung unterworfen war (Methode Rognone), deren Einzelheiten wir nicht kennen; die Bündel dieses Catguts sind indessen tatsächlich geruchlos im Gegensatz zu dem Rohcatgut des Handels und viel homogener und durchscheinender. Für jede Versuchsreihe haben wir Catgut No. 2 und 5 verwendet, d. h. von mittlerer und maximaler Stärke nach der normalen Numerierung. Jede Versuchsreihe mit jeder Catgutnummer wurde in zweifacher Anordnung ausgeführt.

Bei der ersten Versuchsanordnung (wobei wir je ein Muster von jeder Nummer und von jeder entfetteten Rohsorte resp. vom Typus Rognone verwendeten) haben wir Catgutstückchen von etwa 3 cm Länge in lauwarmem Wasser aufgeweicht und dann in Bakterienemulsionen gelegt.

Bei diesen Versuchen wurden folgende Keime angewendet: Staphylokokken (dichte Emulsion von einer 36 Stunden alten Agarkultur in physiologischer Kochsalzlösung); Milzbrandsporen (Emulsion von einer 50 Stunden alten Agarkultur in physiologischer Kochsalzlösung); Sporen von *B. subtilis* (Emulsion von einer 50 Stunden alten Kultur in physiologischer Kochsalzlösung); Tetanusbazillen mit Sporenbildung (5 Tage alte und an Bakterienmaterial reiche Bouillonkultur).

Um bei unseren Versuchen einwandfreie Resultate zu erzielen, haben wir die Keime vorher geprüft, und zwar dadurch, daß wir ihre Widerstandsfähigkeit gegen Wasserdampf und gegen heißes Wasser feststellten, um eventuelle Vergleiche anstellen zu können.

Die Resultate dieser Prüfung waren folgende:

Widerstandsfähigkeit gegen strömenden Wasserdampf (99,8° C).

Milzbrand (Bacillen mit Sporenbildung): sterben in 5 Minuten.

Staphylokokken: sterben in weniger als 1 Minute.

B. subtilis: stirbt in 1 Stunde und 50 Minuten.

Tetanus (Bacillen mit Sporenbildung): sterben in 27 Minuten.

Die Versuche wurden mit infizierten Glaswollbäuschen (1 cm Durchmesser) ausgeführt: unsere Daten beziehen sich auf Untersuchungen in dieser Weise.

Widerstandsfähigkeit gegen heißes Wasser (88° C).

Milzbrand (Bacillen mit Sporenbildung): sterben in 25 Minuten.

Staphylokokken: sterben nach 10 Minuten.

B. subtilis: stirbt nach 7 Stunden.

Tetanusbacillen (mit Sporenbildung): sterben in 1½, Stunde.

* * *

Wir wollen diese Ergebnisse nicht näher besprechen, obwohl sie nicht mit den Zahlen übereinstimmen, welche man gewöhnlich in den Lehrbüchern angegeben findet. So wird allgemein angegeben, daß Tetanussporen bei 80° C in einer Stunde sterben: aus unseren Beobachtungen geht dagegen hervor — und gegen positive Tatsachen kann man ja keinen Einwand erheben — daß das nicht immer der Fall ist.

Die Catgutfäden wurden ½ Stunde in der Bakterienemulsion gelassen, danach in einem H₂SO₄-Exsikkator getrocknet und dann in verschiedener Weise behandelt.

Wo es sich um chemische Behandlungen handelte, wurden die Fäden in sterilem Wasser gewaschen und dann nach der üblichen Methode in Bouillon gesät.

In einer anderen Versuchsreihe haben wir statt der Catgutstückchen bereits gebrauchsfertige Catgutrollen angewendet, d. h. erweicht, infiziert, getrocknet, und in der angegebenen Weise behandelt.

Jeder Versuch wurde einmal wiederholt. Unsere Resultate fassen wir in folgender Tabelle kurz zusammen.

	Angewendete Mikroorganismen	Catgutstücke aus dem Handel, ohne vorherige Desinfektion		Catgutstücke mit Vorbehandlung		Rohes Catgut (Rollen)		Catgut mit Vorbehandlung (Rollen)	
		No. 5	No. 2	No. 5	No. 2	No. 5	No. 2	No. 5	No. 2
Catgut, 2½ Stunden bei 120° C im Trocknen	Milzbrand	—	—	+	+	—	—	—	—
	Staphylokokken	—	—	—	—	—	—	—	—
	B. subtilis	—	+	+	+	+	+	+	+
	Tetanus	+	+	+	+	+	+	+	+
Nach Grimbert (Alkohol bei 120°)	Milzbrand	—	—	—	—	—	—	—	—
	Staphylokokken	—	—	—	—	—	—	—	—
	B. subtilis	—	—	—	—	—	—	—	—
Nach Frederick	Tetanus	—	—	—	—	—	—	—	—
	Milzbrand	—	—	—	—	—	—	—	—
	Staphylokokken	—	—	—	—	—	—	—	—
	B. subtilis	—	+	+	+	+	+	+	+
	Tetanus	+	+	+	+	+	+	+	+
		+	+	+	+	+	+	+	+
		+	+	+	+	+	+	+	+
		+	+	+	+	+	+	+	+

— = steril. + = infiziert.

Aus diesen Resultaten geht hervor, daß nur mit der Methode der Sterilisierung mit Alkohol bei 120° das Catgut vollständig und sicher steril gemacht wird.

Chemische Sterilisierungsmethoden.

Für die Sterilisierung des Catguts hat man eine große Zahl chemischer Methoden vorgeschlagen; man kann sagen, daß alle die che-

mischen Produkte, welche eine desinfizierende Wirkung ausüben (von der ursprünglich von Lister angewendeten Karbolsäure zum Sublimat, von der Methode von Claudius bis zu den Brom- und den übrigen heutigen Methoden) zur Sterilisierung des Catguts angewendet worden sind. Wir werden uns nur mit den älteren Methoden beschäftigen, welche seit langer Zeit sich einer großen Achtung erfreut haben, und unter den neueren nur mit denjenigen, welche entweder wegen der Autorität des Vorschlagenden oder wegen der Art der Prozedur eine besondere Achtung verdienen. So werden wir von der ursprünglichen Listerschen Karbolsäuremethode und von denjenigen von Rapp und Lucas Championnière absehen, welche nur eine Modifikation von ersterer darstellen. Ebenso können wir ohne weiteres erklären, daß die Methoden, bei welchen Sublimat angewendet wird, nämlich diejenigen von Schwartz, Bracotz, Bergmann, und ebenso diejenigen, bei welchen ausschließlich Formaldehyd angewendet wird (die Harringtonsche Methode und die Modifikation von Frederich), keine sichere Sterilisierung erlauben.

Methode nach Claudius.

Dieser Autor wickelt das rohe Catgut zum Rollen und legt diese in folgende Lösung:

Jodkalium	1
Reines Jod	1
Destilliertes Wasser	100

Nachdem das Catgut 8 Tage in dieser Lösung gelegen hat, kann man die Sterilisierung als perfekt ansprechen.

Vor dieser Behandlung wird das Catgut nicht entfettet.

Nach der Sterilisierung wird das Catgut in Alkohol oder in einer 3-proz. Karbolsäurelösung oder in irgendwelcher anderen sterilen Flüssigkeit aufbewahrt. Fuchs empfiehlt dagegen, das Catgut in einer jodhaltigen oder, noch besser, trocken in einem sterilen Gefäß zu verwahren.

Salkindsohn zieht es vor, entfettetes Catgut anzuwenden, welches er 8 Tage in folgender Lösung liegen läßt:

Jod	0,65 g
Alkohol	1,00 „

und auch später verwahrt.

W. Stone hat die Methode von Claudius in der Weise modifiziert, daß er vor der Behandlung mit der wässerigen Jod-Jodkalilösung das Catgut entfettet, 36—48 Stunden in einer 4-proz. Formollösung liegen läßt und 10—12 Stunden in fließendem Wasser wäscht.

Methode (neuere) nach Lister.

Lister bereitet folgende Lösungen:

1. Sublimat	0,5 g
Dest. Wasser	80,0 „

Diese Lösung muß warm bereitet werden; danach läßt man sie abkühlen.

2. Chromsäure	1,0 g
dest. Wasser	60,0 „

wässrige Lösung von schwefeliger Säure usque ad 120 g

Der Lösung von Chromsäure wird so viel schwefelige Säure zugesetzt, bis sich die schöne orangebraune Farbe in eine grüne und dann blaue

umwandelt; zu dieser Zeit ist schon ein Ueberschuß an schwefeliger Säure vorhanden; dieser würde die später zuzusetzende Sublimatlösung abschwächen, indem er eine Präzipitation des Sublimates hervorruft. Diesen Uebelstand beseitigt man dadurch, daß man etwas getrennt gehaltene Chromsäure tropfenweise zusetzt, bis wieder die grüne Farbe erscheint: man setzt Wasser zu bis auf 120, und setzt dann die Sublimatlösung bei.

In dieser Mischung läßt man das Catgut 24 Stunden liegen, wonach man es trocknet. In diesem Zusande kann man es nach Lister steril halten.
(Semaine méd. I. V. 1908.)

Methode von Stich.

Stich sterilisiert das Catgut vermittelt einer 1-proz. Lösung von Silbernitrat in ammoniakalischem Alkohol. Danach werden die Fäden 15—30 Minuten im Dunklen gehalten, in Alkohol gewaschen, in einem sterilen Zylinder dem Sonnenlicht ausgesetzt und zuletzt mit einer Mischung von absolutem Alkohol und 10-proz. Glyzerin behandelt, wonach sie gebrauchsfertig sind. (Centralbl. f. Chirurgie. Bd. XXVI. 1906.)

Methode von Min des.

Das rohe Catgut wird in Filtrierpapier eingewickelt und 2 Tage in einer 1-proz. Lösung von Jod in Benzin gelassen; dann in einer anderen frischen gleichen Lösung 3 Tage gelassen und getrocknet. Danach kann es gebraucht werden. (Centralbl. f. Chirurgie. Bd. LI. 1906.)

Methode von van Ketel, A. B.

Dieser Autor läßt das Catgut 2 Tage in einer Lösung von Bromnatrium und chromsaurem Natron, dann setzt er dieser Lösung etwas Ammoniakbisulfat zu, durch welches Brom frei gemacht wird, welches auf das in die Lösung gelegte Catgut eine desinfizierende Wirkung ausübt.

In dieser Lösung läßt man das Catgut 2 Tage liegen, wonach man es zuerst mit Wasser und dann mit Alkohol (90° C) wäscht. Das bereits gelb gewordene Catgut wird wieder weiß, ohne seine Eigenschaften in bezug auf Festigkeit zu verlieren.

(Handeling Tiende flaam. Nat. en Geneesk Congr. Beiges. 1907.)

Methode von Chlumsky.

Dieser Autor läßt das Catgut in folgender Lösung

reiner Kampfer	60 g
reines Phenol	30 „
Alkohol	5 „

2—3 Stunden liegen, und wäscht es dann mit sterilem Wasser vor dem Gebrauch.
(Deutsche med. Wochenschr. 1908. No. 15.)

Methode von Rognone.

Diese Methode leitet sich von derjenigen von Claudius und von anderen her, und stellt eine Verbesserung derselben dar.

Die Ergebnisse unserer Untersuchungen (s. Tabelle p. 631) sind so klar, daß sie keine besonderen Erörterungen erheischen.

Abgesehen von der Methode Rognone, welche wir aus den erwähnten Gründen nicht ausführlich beschreiben können, gibt es mehrere

Prozeduren, welche auch nach den schweren künstlichen Infizierungen eine perfekte Sterilisierung ermöglichen, nämlich die Methode von Claudius mit Brom, von Lister mit Chromsäure und von van Ketel mit Brom.

Untersuchungen, welche die Verff. in dem Institut für Hygiene der Kgl. Universität zu Parma ausgeführt haben.

		Methode Claudius				Methode Lister				Methode Stich				Methode Mindes				Methode van Ketel				Methode Chlumsky				Methode Rognone			
Mikroorganismen, welche in den Versuchen angewandt wurden		Milzbrand	Staphylokokken	B. subtilis	Tetanus	Milzbrand	Staphylokokken	B. subtilis	Tetanus	Milzbrand	Staphylokokken	B. subtilis	Tetanus	Milzbrand	Staphylokokken	B. subtilis	Tetanus	Milzbrand	Staphylokokken	B. subtilis	Tetanus	Milzbrand	Staphylokokken	B. subtilis	Tetanus	Milzbrand	Staphylokokken	B. subtilis	Tetanus
Reines Catgut aus dem Handel	No. 2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-
	No. 5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-
Catgut nach Vorbehandlung	No. 2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-
	No. 5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-
Reines Catgut (Rollen)	No. 2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-
	No. 5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-
Catgut nach Vorbehandlung (Rollen)	No. 2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-
	No. 5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-

Jeder Versuch wurde wiederholt und die Resultate waren immer übereinstimmend. So geht aus unseren Untersuchungen eine praktisch wichtige Tatsache hervor, nämlich daß man auf verschiedenen Wegen ein vollständig und sicher steriles Catgut herstellen kann.

Wir wollen hier von einigen theoretischen Betrachtungen in bezug auf unsere Versuche absehen, z. B. in bezug auf die größere Widerstandsfähigkeit, welche die Tetanussporen im Vergleich zu den Milzbrandsporen aufgewiesen haben.

Es genügt aber nicht, daß das Catgut gut sterilisiert werden kann; es muß sich auch fest, biegsam, weich und elastisch erhalten.

Untersuchungen in dieser Richtung würden jedenfalls eine große praktische Bedeutung haben; wir haben uns aber, wegen Mangel an den nötigen Instrumenten, darauf beschränkt, vermittelst eines Dynamometers die Widerstandsfähigkeit gegen Ziehung zu prüfen.

Die dynamometrischen Untersuchungen sind nicht frei von Uebelständen; so findet man in einem und demselben Catgutstück Stellen, welche einen schwächeren Widerstand gegen Spannung leisten als andere; außerdem ist die Widerstandsfähigkeit eine verschiedene, je nachdem die Spannung langsam oder ruckweise geschieht.

Wir sind bei unseren Untersuchungen sehr vorsichtig vorgegangen:

jede Zahl stellt das Durchschnittsresultat von 6 Versuchen dar. Zu den Versuchen wurden nur fehlerfreie Catgutstücke angewendet. Das Catgut wurde immer in derselben Weise im Dynamometer befestigt, und die Spannung wurde immer in derselben Weise bestimmt.

Dynamometrische Untersuchungen.

Normales Catgut No. 2 reißt				bei einer Spannung von				8	kg
	No. 5			"	"	"	"	10	"
Catgut	No. 2, "behandelt mit	Alkohol bei	120°	"	"	"	"	7	"
"	No. 5	"	120°	"	"	"	"	9	"
"	No. 2	"	nach Claudius	"	"	"	"	7,5	"
"	No. 5	"	"	"	"	"	"	10	"
"	No. 2	"	Lister	"	"	"	"	7	"
"	No. 5	"	"	"	"	"	"	9	"
"	No. 2	"	van Ketel	"	"	"	"	6,5	"
"	No. 5	"	"	"	"	"	"	8,5	"
"	No. 2	"	Rognone	"	"	"	"	8	"
"	No. 5	"	"	"	"	"	"	10,5	"

Aus obigen Resultaten geht hervor, daß, immer abgesehen von der Prozedur von Rognone, in bezug auf die Festigkeit, resp. die Widerstandsfähigkeit gegen Spannung des Catguts, das Sterilisationsverfahren von Claudius das beste ist.

Diesbezüglich müssen wir jedoch bemerken, daß bei der Jodbehandlung, wenn das Catgut fehlerhafte Punkte hat, diese durch das Jod tief verändert werden; deshalb muß man bei dem Verfahren von Claudius sehr vorsichtig und sorgfältig vorgehen.

Die Alkoholmethode ist auch gut, obwohl dabei der Catgutfaden nicht so stark wird.

Die mit Brom und Chromsäure behandelten Catgutfäden sind schwächer. Dagegen weisen die nach Rognone sterilisierten eine ausgezeichnete Festigkeit auf.

Die Resultate einer groben Untersuchung in bezug auf die allgemeinen Eigenschaften der Catgutfäden kann man folgendermaßen zusammenfassen:

Catgut nach Claudius: Die Fäden sind ziemlich weich, elastisch; ihr Durchmesser ist nicht gewachsen.

Catgut nach van Ketel und nach Lister: Die Fäden sind weich, aber ihr Durchmesser hat etwas zugenommen.

* * *

Wir können also schließen, daß man mit den angegebenen Verfahren sterile und feste Catgutfäden herstellen kann, deren übrige Eigenschaften denjenigen des normalen nicht sterilisierten Catguts gleichen. Unter diesen Verfahren verdient — abgesehen von der Methode von Rognone, welche ausgezeichnete Dienste leistet — dasjenige von Claudius den ersten Platz; danach kommt die Behandlung mit Alkohol bei 120°, dann das Verfahren nach van Ketel und zuletzt dasjenige nach Lister.

Vielleicht wäre es wünschenswert, daß das Verfahren von Claudius etwas verändert würde, um die Beschädigung an den fehlerhaften Punkten zu verhindern, wie es übrigens bei einigen in der Industrie angewendeten und nicht bekannt gemachten Prozeduren geschehen ist.

Nichtsdestoweniger kann man behaupten, daß heutzutage das Catgut

vollständig sterilisiert werden kann, ohne daß dadurch seine Eigenschaften geschädigt werden.

Noch einige Worte über die Konservierung des Catguts. Dieselbe kann auf zwei Wegen, nämlich im trockenen Zustande oder in einem feuchten Mittel, geschehen.

Bei der Konservierung im trockenen Zustande, in zugeschmolzenen Glasröhrchen, spart man an Raum; dieses Verfahren ist für militärärztliche Zwecke, für Kolonialexpeditionen usw. geeignet. Es sei jedoch bemerkt, daß das entfettete Catgut — wie aus einigen von uns ausgeführten dynamometrischen Untersuchungen hervorgeht — an Festigkeit und auch an Biugsamkeit verliert.

Deshalb verwahrt man das Catgut besser in flüssigen Mitteln.

So kann man es sehr gut in Alkohol, in geschlossenen Glasröhren verwahren, obwohl das Catgut in diesem Fall etwas steif wird. Geeigneter erscheinen uns die Mischungen von Alkohol und Sublimat, mit Zusatz von ätherischen Oelen: in diesen bleibt das Catgut steril, ohne seine sonstigen Eigenschaften zu verlieren.

Als Gefäße sind — mit Ausnahme der Präparate für Feldlazarette — nach unserem Dafürhalten die Glasfläschchen mit geschmergeltem Stöpsel den an der Flamme zugeschmolzenen Glasröhren vorzuziehen; bei letzteren ist die Gefahr nicht ausgeschlossen, daß, wenn man die Röhre aufbricht, infizierte Glassplitter auf den Catgutfaden fallen und dadurch seine Sterilität fraglich machen.

Die zugeschmolzenen Glasröhren sind in den Fällen vorzuziehen, wo es sich darum handelt, soviel wie möglich an Raum zu sparen, und wo man voraussichtlich im Augenblicke des Gebrauches kein steriles Gefäß zur Verfügung haben wird, in welches man die Catgutrolle legen kann. In diesen Fällen sind abgespitzte und an einer Flamme zugeschmolzene Glasröhren sehr zweckmäßig, besonders wenn das Ganze so eingerichtet ist, daß ein Ende des Catguts durch das abgespitzte und abgebrochene Ende des Rohres gefaßt und herausgezogen werden kann, ohne den ganzen Catgutfaden zu berühren und zu infizieren.

In der nächsten Mitteilung über diesen Gegenstand werden wir sehen, ob diese Laboratoriumsresultate praktisch verwertet werden können, und unsere Beobachtungen und Erfahrungen über das Verfahren darlegen, welches uns das beste für die Kontrolle resp. Prüfung des Catguts erscheint.

Nachdruck verboten.

Ueber die Wirkung der Leukocyten bei intraperitonealer Cholerainfektion des Meerschweinchens.

[Aus dem bakteriologischen Laboratorium des Karolinischen Institutes in Stockholm.]

Von Prof. Dr. Alfred Pettersson.

Vor einigen Jahren begann ich eine Reihe Untersuchungen, um die Rolle der Leukocyten des Tierkörpers bei der Abwehr der Infektion näher zu studieren. Dabei wurde erstens die bakterizide Wirkung sowohl der Leukocyten selbst als auch die ihrer Extrakte im Reagensgläschen untersucht. Ferner wurde auch die Wirkung der in den Tierkörper injizierten Leukocyten näher studiert.

Keimtötende Wirkung der Leukocyten wurde schon von Hahn (1), Schattenfroh (2), Denys (3) u. a. nachgewiesen. Im allgemeinen wurden die bakteriziden Substanzen der Leukocyten mit denen des Serums als identisch angesehen. Schattenfroh wies freilich bei den ersteren einige Eigenschaften nach, die mit denen der Serumalexine nicht übereinstimmten. Die Leukocyten zeigten meistens größere Hitzebeständigkeit als die Alexine, und ihre Wirkung war nicht, wie die der Serumbakteriolysine, von der Anwesenheit von Neutralsalzen abhängig; schließlich bestand keine Konkordanz zwischen Serum und Leukocyten in bezug auf die keimtötende Wirkung auf verschiedenen Bakterien. Zu der Annahme, daß die bakteriziden Leukocytenstoffe von den Serumalexinen verschieden sind, gelangte Schattenfroh aber nicht.

Durch genaue Untersuchungen der von den Leukocyten hervorgerufenen Bakterizidie kam ich (4) zu der Meinung, daß die Leukocyten keimtötende Substanzen enthalten, die von denen des Serums vollständig zu trennen sind. Diese Substanzen stehen in innigstem Zusammenhang mit den Zellen und werden, solange diese unbeschädigt sind, an die umgebende Flüssigkeit nicht abgegeben. In dieser Hinsicht ähneln sie den Endoenzymen und Endotoxinen und wurden deshalb von mir (1907) Endolysine benannt. Die hauptsächlichsten Unterscheidungsmerkmale sind:

1) Die Endolysine sind öfters hitzebeständiger als die Serumbakteriolysine. Die Hitzebeständigkeit ist eine charakteristische Eigenschaft und es kommt nicht auf die ungleiche Zusammensetzung der Flüssigkeiten, in denen sie gelöst sind, an.

2) Die Wirkungsweise der beiden Substanzen ist in mehreren Fällen ganz verschieden. Die Serumalexine wirken schnell, bisweilen sehr schnell, die Endolysine aber öfters auffallend langsam.

3) Mehrere Serumbakteriolysine passieren Pukall-Filter, während die entsprechenden Endolysine zurückgehalten werden.

4) Durch wiederholtes Schütteln mit Aether kann die keimtötende Wirkung des Serums auf gewisse Bakterien aufgehoben werden, während die der Leukocytenextrakte nicht verändert wird. Dieser Unterschied ist von Kling im hiesigen Laboratorium entdeckt worden.

Die Endolysine sind wie die Alexine komplexe Körper und werden von Alkohol bzw. Alkoholäther aus ihren Lösungen niedergeschlagen.

Außer Endolysinen enthalten die Leukocyten auch auf gewisse Bakterien wirkende alkohollösliche Stoffe.

Auch von Gruber und Futaki (5) sowie von Schneider (6) wurden keimtötende Substanzen der Leukocyten nachgewiesen, welche die genannten Forscher für verschieden von denen des Serums halten. Die Anthrakozidine von Gruber und Futaki sind, wie ich früher hervorgehoben habe, mit den Endolysinen nicht identisch. Wie sich die Leukine von Schneider zu diesen verhalten, will ich vorläufig dahingestellt sein lassen, zumal sie für diese Untersuchung von keiner großen Bedeutung sind.

Die Wirkung der Leukocyten auf verschiedene Infektionserreger hat sich höchst verschieden erwiesen. Ferner unterscheiden sich die Leukocyten verschiedener Tierarten in ihrer Wirkung wesentlich voneinander. So wirken z. B. die weißen Blutkörperchen von Huhn und Hund sowie von der Katze mehr oder weniger stark keimtötend auf Milzbrandbacillen, während die des Meerschweinchens solcher Wirkung fast vollständig entbehren. Die letztgenannten Leukocyten sind unwirksam auch gegen Choleravibrien, rufen aber bedeutende Keimvernichtung von *B. proteus* hervor.

Die Bedeutung der Leukocyten für die Immunität ist ja noch, insofern es sich um die Keimvernichtung handelt, nach fast 30-jähriger, rastloser Arbeit eine viel umstrittene Frage. In bezug auf mehrere Infektionen, z. B. Milzbrand, Streptokokkeninfektion beim Kaninchen, Cholerainfektion beim Meerschweinchen u. a., dürfte man mit vollem Recht behaupten können, daß die Heilung erst mit vollständiger Vernichtung der Krankheitserreger einhergeht. Bakterizide Stoffe, die überall im Körper ihre Wirkung entfalten können, enthalten nur die Körpersäfte und die Leukocyten. In den einfachen Fällen, da nur die einen der genannten Körper auf die betreffenden Krankheitserreger wirkende, keimtötende Substanzen enthalten, scheint mir die Entscheidung, worauf die Keimvernichtung ankommt, nicht allzu schwierig zu treffen sein. Dies aber natürlich nur, insofern die Erklärung sich auf nachgewiesene Tatsachen gründen soll.

Was nun die Meerschweinchenleukocyten betrifft, so mangelt es ihnen an bakterizider Wirkung nicht nur auf die Milzbrandbacillen, sondern auch auf den Typhusbacillus, den Choleravibrio und den Metschnikoffschen Vibrio. Dagegen entfaltet, wie bekannt, das Serum eine keimtötende Wirkung auf die drei letztgenannten Organismen. Buchner sah darin auch den Grund der natürlichen Immunität. Durch die klassischen Arbeiten über die Immunität gegen Cholera und Typhus stellte Pfeiffer die Bedeutung der Serumbakteriolysine für die erworbene Immunität fest.

Meine eigenen (7) mit dem Typhusbacillus und dem Metschnikoffschen Vibrio angestellten Untersuchungen über die Bedeutung der Leukocyten für die Immunität gaben mir keine Veranlassung anzuzweifeln, daß beim Meerschweinchen die Beseitigung dieser Keime durch die bakteriziden Substanzen des Serums geschieht. Weder konnte ich im Reagensgläschen eine keimtötende Wirkung der weißen Blutkörperchen finden, noch machte ich im Tierkörper Beobachtungen, die zu der Annahme berechtigten, daß sie bei der Keimvernichtung eine direkte Rolle spielen. Die Anwesenheit der Leukocyten an der Infektionsstelle hatte freilich auch bei den genannten Infektionen eine große Bedeutung für

den glücklichen Ausgang der Infektion, sie beeinflussten sogar in hohem Grade die Lösung der Vibrionen und Typhusbacillen, dies geschah aber nur indirekterweise dadurch, daß die Leukocyten die Zufuhr von Komplement erleichterten.

Die folgenden Untersuchungen betreffen den Choleravibrio. Den angewandten Stamm stellte mir Herr Geh.-Rat Pfeiffer gütigst zur Verfügung. Seine Virulenz war etwa $\frac{1}{10}$ Oese.

Das Immunserum stammte vom Kaninchen. Der größte Nachteil beim Studium der Anwesenheit von Komplement und seiner Wirkung bei gleichzeitiger Anwesenheit von Leukocyten stellt die phagocytosefördernde Eigenschaft des Immunserums dar. Bei Versuchen in der Bauchhöhle fällt es doch sofort in die Augen, daß verschiedene Sera mit gleichem bakteriolytischem Titer die Phagocytose in recht verschiedenem Maße fördern können. Dies kann auf eine Nichtidentität der Bakteriotropine und der bakteriolytischen Immunkörper hindeuten, die von mehreren Autoren auch angenommen wird. Die Bakteriotropine würden dann gewisse, die Phagocytose hindernde Substanzen der Bakterien unschädlich machen. Es ließe sich gut denken, daß diese letzteren Substanzen durch Erhitzen zerstört werden, ehe die Fähigkeit der Bakterien, Neubildung von bakteriolytischen Immunkörpern hervorzurufen, aufgehoben wird. Gewisse schädliche Einwirkungen der Bakterien auf die Leukocyten, z. B. das Verklumpen, scheinen durch das Erhitzen der ersteren tatsächlich herabgesetzt zu werden. Diesem Gedankengange folgend, wurden die zur Gewinnung von Immunserum bestimmten Tiere nur mit bei 120°C $\frac{1}{2}$ Stunde erhitzten Vibrionen vorbehandelt. Ich erhielt in dieser Weise wirklich ein Serum, bei dessen Verwendung die Phagocytose auffallend langsam einsetzte. Daraus will ich doch keine Schlußfolgerung ziehen in bezug auf die Identität der oben genannten Substanzen, zumal der bakteriolytische Titer des Serums nicht sehr hoch war; er betrug 0,001.

Zuerst wurde untersucht, ob die Widerstandsfähigkeit des Meerschweinchens gegen Cholerainfektion durch Injektion von Leukocyten in ähnlicher Weise erhöht wird wie die gegen Typhusbacillen und die Metschnikoffschen Vibrionen.

Durch Aleuronatinjektion gewonnene, gewaschene Meerschweinchenleukocyten wurden mit lebenden Choleravibrionen und entsprechenden Mengen Choleraimmunserum bzw. Vibrionen allein in die Meerschweinchenbauchhöhle injiziert.

Meerschweinchen, 280 g. 0,02 g Serum K. 288 + 2,0 g Leukocyten + 10 Oesen Choleravibrionen. Sofort: Reichlich gut isolierte Leukocyten, äußerst reichlich nicht agglutinierte Vibrionen, keine Granula. Nach 30 Minuten: Die Leukocyten sind mäßig verklumpt, von den injizierten Vibrionen ist ungefähr die Hälfte frei, ein geringer Teil in Granula umgewandelt, die übrigen sind von Phagocyten aufgenommen. Nach 1 Stunde: Die Leukocyten sind kaum stärker verklumpt als vorher, bedeutend stärkere Phagocytose von meistens Granula, nur eine sehr geringe Menge Vibrionen frei. Das Tier blieb am Leben und war am 3. Tage ganz munter.

Meerschweinchen, 300 g. 0,04 g Serum K. 288 + 5,0 g Leukocyten + 20 Oesen Choleravibrionen. Sofort: Reichlich gut isolierte und gut erhaltene Leukocyten, Massen nicht agglutinierte Vibrionen, keine Granula, keine Phagocytose. Nach 30 Minuten: Die Leukocyten sind stark verklumpt, der größte Teil der injizierten Vibrionen ist von Phagocyten aufgenommen, welche Massen von Granula, aber nur wenige Vibrionen enthalten; außerhalb der Zellen mehr Granula als Vibrionen. Nach 1 Stunde: Die Leukocyten sind noch stärker verklumpt, die Phagocytose ist fortgeschritten, außerhalb der Zellen mehr Granula als Vibrionen. Nach $1\frac{1}{2}$ Stunde: Temperatur $32,8$, die aus der Bauchhöhle herausgenommene Probe enthält nur Lymphocyten, wenige Granula und einzelne Vibrionen. Nach 6 Stunden: Die Bauchhöhlenprobe enthält wieder gut isolierte, polynukleäre Leukocyten in geringer Zahl, aber weder Granula noch Vibrionen.

Das Tier geht in 18 Stunden ein. Die Bauchhöhle enthält große Fetzen verklumpter Leukocyten, eine recht bedeutende Menge flüssigen Exsudats mit gut isolierten, vielkernigen Leukocyten in mäßiger Zahl. Granula oder Vibrionen sind mikroskopisch nicht zu entdecken; in der Kultur von einigen Tropfen des Exsudats gehen aber einzelne Kolonien auf.

Meerschweinchen, 300 g. 0,2 g Serum K. 288 + 30 Oesen Choleravibrionen + 4,7 g Leukocyten. Sofort: Temperatur vor der Injektion 38,0. Reichlich gut isolierte Leukocyten und große Massen nicht agglutiniierter Vibrionen. Nach 1 Stunde: Temperatur 33,9. Die Leukocyten recht stark verklumpt, mäßige Phagocytose, reichlich freie Vibrionen, wenige Granula. Nach 2 Stunden: Temperatur 34,1, Leukocyten etwas mehr verklumpt, bedeutend stärkere Phagocytose hauptsächlich von Granula, immerfort zahlreiche freie Vibrionen und mäßig reichlich Granula. Nach 4 Stunden: Temperatur 32,1. Die Leukocyten ganz voll von Granula, wenige freie Vibrionen und Granula. Das Tier geht innerhalb 18 Stunden ein. Die Bauchhöhle enthielt Fetzen von Leukocyten sowie flüssiges Exsudat mit einzelnen Vibrionen. Aus dem Inhalte gingen nur wenige Kolonien auf.

Meerschweinchen, 300 g. 0,2 g Serum K. 288 + 30 Oesen Choleravibrionen + 7 g Leukocyten. Sofort: Temperatur vor der Injektion 38,0. Massen gut isolierter Leukocyten und Vibrionen. Nach 1 Stunde: Temperatur 33,5, Leukocyten mäßig verklumpt, starke Phagocytose von Granula, außerhalb der Zellen ziemlich reichlich Granula, einzelne Vibrionen. Nach 3 Stunden: Temperatur 32,9, Leukocyten etwas weiter verklumpt, ganz voll von Granula, zahlreiche freie Granula, Vibrionen dagegen sind nicht zu sehen. Nach 5 Stunden: Temperatur 33,1, vereinzelt freie Granula. Am 2. Tage ist die Temperatur 34,7, das Tier sieht krank aus, lebt aber bis in die Nacht auf den 4. Tag. Die Bauchhöhle enthielt reichlich Fetzen von verklumpten Leukocyten, kleine Menge flüssigen Exsudats mit wenigen deformierten Vibrionen, die Kultur geben.

Meerschweinchen, 280 g. 2,5 g Leukocyten + 5 Oesen Choleravibrionen. Sofort: Reichlich gut isolierte Vibrionen und Leukocyten. Nach 1 Stunde: Die Leukocyten recht stark verklumpt, unbedeutende Phagocytose, nur ein kleiner Teil der Leukocyten enthält Granula in geringer Zahl, reichlich freie Vibrionen und wenige Granula. Nach 4 Stunden: Die Leukocyten nicht viel stärker verklumpt als vorher, mäßige Phagocytose, die Zellen enthalten sowohl Granula als Vibrionen, die freien Vibrionen mindestens ebenso zahlreich als sofort nach der Injektion. Das Tier geht in der Nacht ein. Die Bauchhöhle enthält viel flüssiges Exsudat und äußerst reichlich Vibrionen, die Leukocyten verklumpt zu Fetzen zwischen den Gedärmen.

Es ist aus den wiedergegebenen Versuchen sofort einleuchtend, daß die Fähigkeit des Meerschweinchenkörpers, bei Anwesenheit von Immunsérum Choleravibrionen in einer Bauchhöhle aufzulösen, durch die Leukocyten gewaltig erhöht wird. Die Versuche geben aber auch zu weiteren Betrachtungen Anlaß. In mehreren Versuchen war eine bedeutende extracelluläre Granulabildung wahrzunehmen, trotz der großen Menge von Leukocyten. Daß die Vibrionen schon außerhalb der Zellen auch wirklich gelöst werden, geht aus dem rapiden Temperaturfall deutlich hervor. Nun enthalten, wie ich vorher mehrmals hervorgehoben habe, die gewaschenen Meerschweinchenleukocyten kein passendes Komplement zu den Choleraambozeptoren. Diese Tatsache ist in bezug auf die Typusbacillen auch im Metschnikoffschen Laboratorium von Korschun (8) bestätigt worden. Die Auflösung der Vibrionen außerhalb der Leukocyten muß folglich von dem Komplement der Körperflüssigkeit abhängen. Man wird sich leicht davon überzeugen können, daß die extracelluläre Granulabildung bisweilen weit größer sein kann als bei Injektion von Vibrionen und Immunsérum allein. Jedoch gibt die Menge der wahrgenommenen Granula selbstverständlich keinen genügenden Ausdruck der extracellulären Körnchenumwandlung der Vibrionen, denn Granula werden in großer Zahl sofort von den Phagocyten aufgenommen. Es dürfte keinem Zweifel unterliegen, daß in gewissen Fällen die Leukocyten ein reichlicheres Auftreten von Granula außerhalb der Zellen veranlassen. Dies setzt eine Vermehrung vom Komplement-

gehalte der Bauchhöhle voraus, d. h. eine gesteigerte Zufuhr vom Komplement aus den Gefäßen, denn aus den Leukocyten kommt es, wie oben dargetan ist, nicht.

Bei den größeren Infektionsdosen ging die Granulabildung bezw. das Verschwinden der Vibrionen sehr langsam. Bei Injektion von 1 Oese Vibrionen ist die Granulabildung in $\frac{1}{2}$ Stunde erledigt, bei Injektion von 20 Oesen oder mehr kann sie 4 Stunden oder noch länger dauern. Die Menge Komplement, welche der Körper spenden kann, ist natürlicherweise beschränkt. Die Menge lebender Vibrionen, die ein Tier von der hier benutzten Größe überhaupt vernichten kann, dürfte nicht größer sein als 30 Oesen. Vollständige Sterilität war bei dieser Dosis Vibrionen auch bei Mitgabe großer Mengen Leukocyten und Serum nicht zu erreichen. Unzweifelhaft ist die langsame Vibriolyse ein Zeichen, daß das Komplement unzureichend ist. Wäre das Komplement für das Vernichten der Vibrionen, sobald diese von den Leukocyten aufgenommen sind, belanglos, so müßten fast beliebig große Mengen Vibrionen bei genügend großem Zusatz von Immunserum und Leukocyten injiziert werden können. Bei der Injektion von 30 Oesen Vibrionen war aber mit der größeren Leukocytenmenge wenig besseres Ergebnis zu erhalten als mit der kleineren.

Ist die Annahme richtig, daß der Mangel an Komplement die Ursache bildet, daß auch bei zureichenden Mengen von Immunserum und Leukocyten nur ein gewisses Maß Vibrionen vom Meerschweinchenkörper beseitigt wird, so ist es natürlich, daß er, der Mühe des Abtötens der Vibrionen überhoben, weit größere Mengen von ihnen vertragen muß. Würden die Vibrionen dagegen von den Leukocyten vernichtet werden, so ist von vornherein schwer einzusehen, daß das Meerschweinchen bei obiger Versuchsanordnung größere Mengen der toten Vibrionen ertragen würde als der lebenden. Die Versuche wurden deshalb mit durch $\frac{1}{2}$ -stündiges Erhitzen bei $+56^{\circ}$ getöteten Vibrionen wiederholt.

Meerschweinchen, 270 g. 0,04 g Serum K. 288 + 5 g Meerschweinchenleukocyten + 20 Oesen getöteter Choleravibrionen. Sofort: Massen gut isolierter Vibrionen und Leukocyten. Nach 30 Minuten: Von den injizierten Vibrionen ist nur ein kleiner Teil frei, teils als Vibrionen, teils als Granula. Die Leukocyten sind stark verklumpt, intensive Phagocytose von Granula. Nach 1 Stunde: Zahlreiche freie Granula, aber keine Vibrionen. Die Leukocyten noch stärker verklumpt. Nach 2 Stunden: Einzelne freie Granula; der Bauchhöhleninhalt enthält mehr isolierte Leukocyten als vorher. Das Tier bleibt am Leben.

Meerschweinchen, 280 g. 0,08 g Serum K. 288 + 6 g Meerschweinchenleukocyten + 30 Oesen getöteter Choleravibrionen. Sofort: Massen gut isolierter Vibrionen und Leukocyten. Nach 30 Minuten: Von den injizierten Vibrionen nur ein Teil freiestens als Granula. Intensive Phagocytose, die Leukocyten sind ganz voll von Granula und Vibrionen, die letzteren doch bedeutend weniger zahlreich als die ersteren. Nach 1 Stunde: Temperatur 34,7. Die Leukocyten sehr stark verklumpt, noch stärkere Phagocytose, zahlreiche freie Granula, einzelne Vibrionen. Nach 2 Stunden: Temperatur 35,1, einzelne freie Granula. Das Tier lebt, Gewicht am 4. Tage 250 g.

Meerschweinchen, 290 g. 0,1 g Serum K. 288 + 3,0 g Kaninchenleukocyten und 2,0 g Meerschweinchenleukocyten + 40 Oesen getöteter Choleravibrionen. Sofort: Wie in den vorigen Versuchen. Temperatur vor der Injektion 37,4. Nach 30 Minuten: Temperatur 37,6. Die Leukocyten so stark verklumpt, daß nur wenige bei der Entnahme der Bauchhöhlenprobe erhalten werden, diese sind aber ganz voll von Granula. sehr wenig freie Granula und noch weniger Vibrionen. Nach 1 Stunde: Temperatur 37,9. Weder freie Granula noch Vibrionen. Das Tier lebt, Gewicht am 3. Tage 380 g.

Meerschweinchen, 280 g. 0,12 g Serum K. 288 + 7,0 g Kaninchenleukocyten + 50 Oesen getöteter Choleravibrionen. Temperatur vor der Injektion 37,5. Sonst wie vorher. Nach 30 Minuten: Temperatur 36,0. Die Leukocyten stark verklumpt, intensive

Phagocytose, die Zellen enthalten nebst Granula auch sehr reichlich Vibrionen, nur eine geringe Menge Vibrionen und Granula frei. Nach 1 Stunde: Temperatur 33,4, noch stärkere Phagocytose von Granula und Vibrionen, nur wenige solcher frei. Nach 4 Stunden: Temperatur 37,1. Das Tier bleibt am Leben, Gewicht am 3. Tage 260 g.

Meerschweinchen, 310 g. 0,2 g Serum K. 288 + 4,75 g Meerschweinchenleukocyten + 60 Oesen getöteter Choleravibrionen. Temperatur vor der Injektion 37,8. Nach 1 Stunde: Temperatur 35,9, die stark verklumpten Leukocyten enthalten Vibrionen und Granula in großer Menge, nur ein kleiner Teil der eingeführten Vibrionen sind noch frei, meistens als Vibrionen, in geringer Menge als Granula. Nach 1 $\frac{1}{2}$ Stunde: Die aus der Bauchhöhle entnommene Probe enthält nur zusammengebackene Leukocyten, die ganz überfüllt sind von Vibrionen und Granula, wenige freie Vibrionen, und noch weniger freie Granula. Nach 5 Stunden: Temperatur 36,3, keine freien Vibrionen oder Granula. Die Bauchhöhle enthält wieder reichlich gut isolierte Leukocyten, die aber keine Vibrionen oder Granula enthalten. Das Tier überlebte, war am 4. Tage ganz munter und wog 285 g.

Meerschweinchen, 290 g. 0,4 g Serum K. 288 + 7,5 g Meerschweinchenleukocyten + 11 Schrägagarkulturen (80–90 Oesen) Choleravibrionen, die durch $\frac{1}{2}$ -ständiges Erhitzen bei +56° getötet worden waren. Temperatur vor der Injektion 37,7. Sofort: Reichlich Leukocyten und ungeheure Massen Vibrionen, beide gut isoliert. Nach 1 $\frac{1}{2}$ Stunde: Temperatur 34,5. Bedeutende Phagocytose, zum größten Teil von Granula, bedeutend weniger von Vibrionen. Große Massen freie Vibrionen, wenig freie Granula, Leukocyten wenig verklumpt. Nach 1 Stunde: Temperatur 33,8. Die Phagocytose noch stärker, etwas reichlicher freie Granula. Nach 2 Stunden: Temperatur 36,0. Noch stärkere Phagocytose, immerfort aber eine bedeutende Menge freie Vibrionen und weniger reichlich Granula. Die Leukocyten wenig verklumpt. Nach 4 Stunden: Temperatur 34,8. Die Leukocyten etwas stärker verklumpt, die Granula der Phagocyten sind weniger deutlich, einzelne freie Vibrionen und Granula. Nach 18 Stunden: Temperatur 34,4. Das Tier sieht sehr krank aus. Nach 24 Stunden: Temperatur 36,1. Nach 36 Stunden: Temperatur 38,1. Das Meerschweinchen sieht erschlaft aus und aus dem Darm geht blutiger Schleim in geringer Menge ab, es fängt jedoch an zu fressen. Nach 48 Stunden: Temperatur 38,4. Das Tier erholte sich sichtbar und der Appetit kam wieder, wurde sodann am 4. Tage plötzlich schlechter und ging am Anfang des 5. Tages ein. Gewicht am 4. Tage 240 g. Die Bauchhöhle enthielt nebst den zusammengeballten Leukocyten kapseltragende Diplokokken in mäßiger Zahl.

Am Tode des letzten Meerschweinchens hatten die Choleravibrionen wohl wenig direkte Schuld. Es ging an Sekundärinfektion ein, die bei diesen hohen Dosen Vibrionen mehrmals vorkam.

Die Versuche demonstrieren auf schönste Weise die Fähigkeit der Leukocyten, die Gifte unschädlich zu machen. Die größte injizierte Menge Vibrionen war ein bedeutendes Multiplum der Dosis minima letalis toter Vibrionen. Die Quantität von diesen, die man einem Meerschweinchen injizieren kann, ohne daß es eingeht, scheint ganz einfach davon abzuhängen, wieviel Leukocyten und Immunserum dem Tiere eingeführt werden kann. Da die Dosis maxima von lebenden Vibrionen bedeutend kleiner ist, so spricht dies durchaus gegen die Annahme, daß die Leukocyten eine abtötende Wirkung auf die Choleravibrionen entfalten. Im Gegenteil muß man daraus schließen, daß, auch wenn die Leukocyten in reichlicher Menge anwesend sind, das Komplement des Serums für die Vibrionenauflösung nötig ist.

Bemerkenswert ist die Erscheinung, daß große Massen von Vibrionen noch nach mehreren Stunden zwischen den Leukocyten ziemlich unverändert zu finden waren. Dies deutet unzweifelhaft auf einen Mangel an Komplement, da der Immunkörper immer in Ueberschuß vorhanden war.

Vor einiger Zeit wurde von Weil (9) ein Versuch gemacht, zu zeigen, daß bei der intraperitonealen Cholerainfektion des Meerschweinchens die Leukocyten bakterizide Tätigkeit entfalten. Weil hat sich ein Cholera-vibrionenextrakt auf die Weise bereitet, daß in destilliertem Wasser auf-

geschwemmte Choleravibrionen $1\frac{1}{2}$ —2 Stunden auf 60° erhitzt wurden. Die Vibrionen wurden danach durch Zentrifugieren vollständig entfernt und zur klaren Flüssigkeit NaCl bis zum Gehalt der physiologischen Lösung zugesetzt. Dieses Extrakt gab mit Choleraimmunserum Präzipitation und absorbierte in ziemlich hohen Verdünnungen zusammen mit Immunserum das Meerschweinchenkomplement. Das Extrakt hob auch bei gewöhnlichen Meerschweinchen die Schutzwirkung des Choleraimmunserums auf; es absorbierte in der normalen Bauchhöhle das für die Vibriolyse nötige Komplement und die Tiere gingen deshalb zufolge Cholerainfektion ein. Mit Bouillon zweimal intraperitoneal vorbehandelte Tiere blieben dagegen bei gleicher Infektionsweise am Leben. Daraus zieht Weil diese Schlußfolgerung: Das Komplement ist durch das Extrakt und das Immunserum absorbiert worden; Vibrionenvernichtung kann deshalb nicht in gewöhnlicher Weise durch Immunkörper und Komplement stattfinden; die Vibrionen gehen aber nach ihrer Aufnahme von den Leukocyten zugrunde, folglich muß ihre Vernichtung auf die Wirksamkeit der Leukocyten zurückgeführt werden. Weil tritt infolgedessen der von mir gelegentlich meiner Untersuchungen über Typhusbacillen und Metschnikoffschen Vibrionen geäußerten Meinung entschieden entgegen, daß die Bakterienauflösung auch innerhalb der Leukocyten auf Einwirkung von Serumimmunkörper und Komplement ankommt.

Meine obengenannten Versuche waren in ähnlicher Weise wie die jetzigen über Cholera angestellt worden. Um die eigenen Schutzkräfte des Versuchstieres soviel als möglich auszuschließen, wurden große Dosen des Infektionsstoffes injiziert und um die Leukocyten in genügender Menge und ohne Veränderung des Tieres zu erhalten, wurden sie von fremden Tieren verschafft. Weil ist in beiden Beziehungen von der von mir gewählten Methodik abgewichen. Er hat nur kleine Infektionsdosis benutzt und weiter die Leukocyten des Versuchstieres selbst verwendet, die nach vorheriger zweimaliger Bouilloninjektion in der Bauchhöhle angesammelt waren. Wenn ein Nachweis der Unabhängigkeit der Vibriolyse vom Komplemente des Serums beabsichtigt wird, so müssen Versuche mit kleinen Mengen Vibrionen überzeugender wirken, weil der Ausfall in solchem Falle nicht auf Komplementmangel ankommen kann. Die erste Abweichung kann folglich als gut begründet angesehen werden. Die zweite Veränderung der Versuchsanordnung, die Anhäufung der Leukocyten des Versuchstieres in die Bauchhöhle durch vorherige Bouilloninjektionen, muß ich als eine unzweifelhafte Verschlechterung betrachten. Meines Wissens ist kein Beweis erbracht, daß bei Injektion von positiv chemotaktisch wirkenden Stoffen in die Bauchhöhle nur die Leukocyten in größerer Menge als gewöhnlich aus den Gefäßen austreten. Weil hat auch keinen Beweis dafür gegeben. Inzwischen wird von ihm, ebenfalls ohne Beweis, behauptet, daß eine leukocytenreiche Bauchhöhle sehr arm an Komplement sei. Ich will im folgenden versuchen, den Beweis des Gegenteils zu erbringen, d. h. daß die Meerschweinchenbauchhöhle, wenn sie reichlich Leukocyten enthält, auch reich an Komplement ist.

Es kann ohne Schwierigkeit außerhalb des Tierkörpers entweder durch bakterizide Reagensgläschenversuche oder durch Studium der Granulabildung exakt bestimmt werden, ob beim Anfang der Infektion ein bestimmter Unterschied bestehe in bezug auf Komplementgehalt zwischen einer normalen und einer leukocytenreichen Bauchhöhle.

Die bakteriziden Versuche wurden folgendermaßen ausgeführt. 260—300 g schwere Meerschweinchen wurden zweimal mit warmer Bouillon intraperitoneal vorbehandelt. Etwa 12 Stunden nach der letzten Injektion wurden sie durch Halsabschneiden getötet und entblutet. Gleich danach wurde die Bauchhöhle geöffnet und mit Bouillon ausgespült, bis die aufgeholte Flüssigkeit 10 ccm betrug. Diese wurde mit einer sehr kräftigen Zentrifuge (7000 Umdrehungen pro Minute) ganz klar zentrifugiert. In derselben Weise wurde mit gleich großen normalen Meerschweinchen verfahren. Von den beiden Spülflüssigkeiten wurden verschieden große Mengen zu Röhrchen mit je 0,0002 bzw. 0,0001 ccm Choleraimmunserum in 0,2 ccm Kochsalzlösung zugesetzt. Die Röhren wurden sodann bis zu 1,0 ccm angefüllt. Einsaat: $\frac{1}{100}$ Oese Cholera vibrien pro Kubikzentimeter.

A. Normale Meerschweinchen.

Meerschweinchen, 260 g.				Keimzahl	Sofort	Nach 3 Std.	Nach 7 Std.
0,0002 ccm Immunserum						> 800 000	
0,0002 "	"	+ 0,1 ccm Spülflüssigkeit			ca. 200 000	> 75 000	∞
0,0002 "	"	+ 0,2 "	"			17 700	> 300 000
0,0002 "	"	+ 0,4 "	"			8 876	> 300 000
Meerschweinchen, 280 g.							
0,0002 ccm Immunserum						> 800 000	
0,0002 "	"	+ 0,1 ccm Spülflüssigkeit			ca. 200 000	> 800 000	∞
0,0002 "	"	+ 0,2 "	"			12 098	> 300 000
0,0002 "	"	+ 0,4 "	"			4 515	> 300 000
0,0002 "	"	+ 0,8 "	"			1 472	11 200
0,0001 "	"	+ 0,2 "	"			> 600 000	∞
0,0001 "	"	+ 0,4 "	"			4 134	> 800 000
0,0001 "	"	+ 0,8 "	"			3 622	24 000
Meerschweinchen 300 g.							
0,0002 ccm Immunserum						> 800 000	
0,0002 "	"	+ 0,1 ccm Spülflüssigkeit			ca. 200 000	> 600 000	∞
0,0002 "	"	+ 0,2 "	"			1 844	> 800 000
0,0002 "	"	+ 0,4 "	"			3 052	212 000
0,0002 "	"	+ 0,8 "	"			1 008	25 900
0,0001 "	"	+ 0,2 "	"			> 800 000	∞
0,0001 "	"	+ 0,4 "	"			> 800 000	∞
0,0001 "	"	+ 0,8 "	"			128 000	> 800 000

B. Mit Bouillon zweimal behandelte Meerschweinchen.

Meerschweinchen, 260 g.				Keimzahl	Sofort	Nach 3 Std.	Nach 7 Std.
0,0002 ccm Immunserum						> 800 000	
0,0002 "	"	+ 0,1 ccm Spülflüssigkeit			ca. 200 000	1 968	10 000
0,0002 "	"	+ 0,2 "	"			1 344	5 342
0,0002 "	"	+ 0,4 "	"			0	0
Meerschweinchen, 280 g.							
0,0002 ccm Immunserum						> 800 000	
0,0002 "	"	+ 0,1 ccm Spülflüssigkeit			ca. 200 000	118 000	Versuchung
0,0002 "	"	+ 0,2 "	"			3 498	8 500
0,0002 "	"	+ 0,4 "	"			3 870	4 579
0,0002 "	"	+ 0,8 "	"			31	8
0,0001 "	"	+ 0,2 "	"			14 600	95 000
0,0001 "	"	+ 0,4 "	"			4 512	11 000
0,0001 "	"	+ 0,8 "	"			4 184	62

Meerschweinchen, 300 g.

	Keimzahl	Sofort	Nach 3 Std.	Nach 7 Std.
0,0002 ccm Immuneserum			> 800 000	
0,0002 " " + 0,1 ccm Spülflüssigkeit		ca. 200 000	1 700	2 671
0,0002 " " + 0,2 " "			2 018	3 943
0,0002 " " + 0,4 " "			2 862	1 424
0,0002 " " + 0,8 " "			3	5
0,0001 " " + 0,2 " "			1 908	2 665
0,0001 " " + 0,4 " "			58	700
0,0001 " " + 0,8 " "			1	0

0,5 g gewaschene Meerschweinchenleukocyten wurde einem 280 g schweren Meerschweinchen intraperitoneal injiziert. Nach 25 Minuten wurde das Tier durch Halsabschneiden getötet und entblutet. Die Bauchhöhle wurde mit Bouillon ausgespült, bis die aufgeholte Spülflüssigkeit 10 ccm betrug. Von der zentrifugierten Spülbouillon wurden, wie früher, verschieden große Mengen zu Röhrchen mit je 0,0001 ccm Immuneserum zugesetzt. Einsaat: $\frac{1}{100}$ Oese Cholera-vibrionen pro Kubikzentimeter.

Meerschweinchen, 280 g.

	Keimzahl	Sofort	Nach 2 Std.	Nach 7 Std.
0,0002 ccm Immuneserum			> 800 000	
0,0002 " " + 0,1 ccm Spülflüssigkeit		ca. 200 000	> 350 000	∞
0,0002 " " + 0,2 " "			664	> 200 000
0,0002 " " + 0,4 " "			36	28 600
0,0002 " " + 0,8 " "			5	1 664
0,0001 " " + 0,2 " "			1 472	> 200 000
0,0001 " " + 0,4 " "			224	> 30 000
0,0001 " " + 0,8 " "			26	1 242

Die wiedergegebenen Versuche sind nicht ausgewählte, sondern sie stellen eine fortlaufende Reihe solcher dar. Es soll auch bemerkt werden, daß die durch die Platten angegebene Verminderung der Keime keine scheinbare, durch Agglutination vorgetäuschte war. Die Proben wurden nämlich stets auch mikroskopisch genau untersucht, und die dadurch erhaltenen Resultate mit den Platten verglichen. In allen Fällen mußte die durch die letzteren angezeigte deutliche Keimverminderung auf wirkliche Vibriolyse zurückgeführt werden.

Die durch den Bauchhöhleninhalt hervorgerufene Granulabildung wurde auf ähnliche Weise wie die Bakterizidie untersucht.

Ein 300 g schweres Meerschweinchen wurde zweimal mit warmer Bouillon intraperitoneal vorbehandelt. 12 Stunden nach der letzten Injektion wurde das Tier durch Halsabschneiden getötet und die Bauchhöhle mit Bouillon ausgespült, bis 10 ccm Spülflüssigkeit erhalten wurde. In derselben Weise wurde mit einem gleich großen normalen Tiere verfahren. Die Spülflüssigkeiten wurden zentrifugiert.

0,0002 ccm Choleraimmuneserum + 0,4 ccm Spülflüssigkeit des normalen Meerschweinchens + $\frac{1}{100}$ Oese Cholera-vibrionen. Die Probe wurde bei + 37° gehalten.

Sofort: Gut isolierte Vibrionen.
Nach 10 Minuten: Keine Granula.
Nach 20 Minuten: Keine Granula.

Nach 30 Minuten: Wenige Granula.

0,0002 ccm Choleraimmuneserum + 0,4 ccm Spülflüssigkeit des mit Bouillon vorbehandelten Meerschweinchens + $\frac{1}{100}$ Oese Cholera-vibrionen. Die Probe wurde bei + 37° gehalten.

Sofort: Gut isolierte Vibrionen.
Nach 10 Minuten: Einzelne Granula.
Nach 20 Minuten: Viele Granula, aber mehr Vibrionen als Granula.

Nach 30 Minuten: Mehr Granula als Vibr.

Sowohl die bakteriziden Versuche als das Studium der Granulabildung zeigen übereinstimmend, daß die leukocytenreiche Bauchhöhle schon bei der Einführung der Vibrionen reicher an Komplement ist als die normale. Das Komplement der Bauchhöhle beim Eintritt der Infektion

würde aber, soweit man aus den mitgeteilten Versuchen schließen darf, keineswegs zur Auflösung der injizierten Vibrionen langen. Es würde schon von einem kleinen Teil derselben vollständig absorbiert werden. Es mußte deshalb näher untersucht werden, ob während des weiteren Verlaufes der Infektion Komplement vorhanden sei oder nicht, und wenn ja, wie aus den vorigen Versuchen mit lebenden und toten Vibrionen hervorzugehen scheint, ob immerfort ein Unterschied zu finden wäre zwischen der normalen und leukocytenreichen Bauchhöhle.

Je 2 Meerschweinchen wurden mit Bouillon zweimal intraperitoneal vorbehandelt. Etwa 12 Stunden nach der letzten Bouilloninjektion wurde das größere Tier getötet, die Leukocyten der Bauchhöhle aufgesammelt, gewaschen und einem normalen mit dem zweiten bouillonbehandelten gleich großen Meerschweinchen intraperitoneal injiziert. So dann wurden beiden Tieren Choleravibrionen und Immunsrum in die präparierte Bauchhöhle eingespritzt.

A. Meerschweinchen, 280 g. Leukocyten (= etwa 0,4 g) von einem 360 g schweren Meerschweinchen + 0,002 g Immunsrum + 2 Oesen Choleravibrionen.

Sofort: Reichlich gut isolierte Vibrionen und viele Leukocyten.

Nach 15 Minuten: Die Leukocyten so stark zusammengeballt, daß nur wenige mit der Kapillare aus der Bauchhöhle erhalten werden. Höchstens die Hälfte der injizierten Vibrionen scheint von den Leukocyten aufgenommen worden, reichlich freie Vibrionen, wenige Granula.

Nach 30 Minuten: Wenige freie Granula, zahlreiche freie Vibrionen.

B. Mit Bouillon zweimal vorbehandeltes, 280 g schweres Meerschweinchen. 0,002 g Immunsrum + 2 Oesen Choleravibrionen.

Sofort: Ungefähr wie in A.

Nach 15 Minuten: Leukocyten verklumpt, ungefähr wie in A. Die von den Phagocyten aufgenommenen Vibrionen kaum zahlreicher als in A, freie Granula fast gleich reichlich wie Vibrionen.

Nach 30 Minuten: Zahlreiche freie Granula, wenige freie Vibrionen.

A. Meerschweinchen, 270 g. Leukocyten (= 1,0 g) von einem 480 g schweren Meerschweinchen + 0,002 g Immunsrum + 2 Oesen Choleravibrionen.

Nach 15 Minuten: Leukocyten mäßig verklumpt, ein großer Teil der injizierten Vibrionen von den Leukocyten nicht aufgenommen, meistens als Granula, sehr wenige als unveränderte Vibrionen.

Nach 30 Minuten: Die Leukocyten so stark zusammengeballt, daß mittelst der Kapillare keine solchen erhalten werden. Einzelne Vibrionen, zahlreiche Granula.

B. Mit Bouillon zweimal vorbehandeltes Meerschweinchen von 270 g Gewicht. 0,002 g Immunsrum + 2 Oesen Choleravibrionen.

Nach 15 Minuten: Leukocyten stark verklumpt. Der von den Leukocyten nicht aufgenommene Teil der injizierten Vibrionen ungefähr so groß wie in A. Viele Vibrionen, aber noch mehr Granula.

Nach 30 Minuten: Die Leukocyten nicht so stark verklumpt wie in A. Etwa gleich reichlich freie Vibrionen und Granula, zusammen, jedoch vielleicht weniger zahlreich als in A.

Alle Tiere blieben am Leben. 15 Minuten nach der Injektion war die Menge freier Granula in diesen Versuchen sicher mindestens ebenso groß, wie nach der gleichen Zeit bei einem normalen gleich großen Tiere nach Einführung von 1 Oese Vibrionen und entsprechender Menge Immunsrum. Wenn aus der extracellulären Granulabildung auf die Anwesenheit von Komplement geschlossen werden darf, so geht aus diesen Versuchen unzweifelhaft hervor, daß auch während der Infektion die leukocytenreiche Bauchhöhle keineswegs ärmer, sondern im Gegenteil reicher an Komplement ist, als die normale. Es kann nämlich nicht verneint werden, daß auch die von den Phagocyten aufgenommenen Vibrionen — geschweige denn die Granula — mit Komplement beladen waren.

Es entsteht nun die Frage: Woher stammt das Komplement? Die untersuchten Bauchhöhlen enthielten entweder nach der Metschnikoffschen Methode angesammelte Leukocyten oder auch injizierte gewaschene solche von einem fremden Tiere. Die Leukocyten, die nach der intraperitonealen Bouilloninjektion sich in der Bauchhöhle sammeln, zeichnen sich nach Metschnikoff gerade dadurch aus, daß sie nicht phagolysiert werden, d. h. kein Komplement abgeben. Die gewaschenen Meerschweinchenleukocyten liefern, meiner Erfahrung nach, auch kein auf Choleravibrionen und Typhusbacillen wirkendes Komplement. Dies ist in bezug auf die letzteren in Metschnikoffs Laboratorium von Korschun bestätigt worden. Das vorhandene Komplement stammt also nicht aus den Leukocyten der Bauchhöhle. Es gibt dann keine andere Wahl als anzunehmen, daß es aus den Blutgefäßen dahingeführt worden ist. Die Zufuhr wird offenbar durch die Leukocyten beeinflusst. In den letzten oben wiedergegebenen Versuchen war die extracelluläre Granulabildung am stärksten, und folglich der Komplementgehalt am größten bei den Tieren, denen die größte Menge Leukocyten injiziert worden war. Der Reiz, den die Vibrionen auf die Gefäße ausüben, wird durch die Leukocyten in irgendeiner Weise geändert, so daß die auftretende Exsudatflüssigkeit mehr Komplement enthält, als bei Abwesenheit von Leukocyten.

Die Behauptung von Weil, daß eine leukocytenreiche Bauchhöhle arm an Komplement sei, ist völlig unrichtig. Sie ist im Gegenteil, wie meine Versuche dargetan haben, sowohl im Anfang als während des Verlaufes der Infektionsbekämpfung reicher an Komplement, als eine normale. Damit wird der von Weil geistreich aufgebauten Hypothese, daß die Meerschweinchenleukocyten imstande seien, ohne Zuhilfenahme von Komplement die Choleravibrionen aufzulösen, die einzige Stütze vollständig entzogen. Weil gibt selbst zu, daß die eingespritzte Menge des Cholera-vibrionenextraktes nicht langte, um alles Komplement aus der normalen Bauchhöhle zu absorbieren, denn bei hohen Dosen von Immunserum fand Bakteriolyse dennoch statt, wenn auch verlangsamt und auf längere Zeit verteilt. Langte das Vibrionenextrakt nicht, um das Komplement aus der normalen Bauchhöhle zu absorbieren, so genügte es noch weniger, um die schon von Anfang an komplementreichen, leukocytenhaltige Bauchhöhle komplementfrei zu machen, zu der überdies das Komplement in größerer Menge zuströmt, als zu der nicht leukocytenhaltigen.

Daß die Leukocyten Komplement wirklich spenden können, dürfte wohl jetzt allgemein anerkannt sein. Selber habe ich z. B. solche, die auf Milzbrandbacillen und *B. proteus* wirken, nachgewiesen. Versuche, auf Choleravibrionen wirkendes Komplement bei den gewaschenen Meerschweinchenleukocyten einwandfrei nachzuweisen, sind ebensowenig mir, wie meinen Vorgängern gelungen. Die Leukocyten nehmen aber Vibrionen in großer Menge auf und ihre Auflösung findet in gewöhnlicher Weise innerhalb dieser Zellen statt, die außerhalb des Tieres nicht imstande sind, auch nur wenige Vibrionen zu vernichten. Aus dem vorigen geht ferner hervor, daß eine leukocytenreiche Bauchhöhle bedeutende Mengen Komplement enthält. Unter solchen Umständen ist die einzige wahrscheinliche Erklärung der reichlichen Vibriolyse in den Phagocyten, daß die Vibrionen sich vor der Phagocytose mit Komplement beladen haben, das nach derselben seine Wirkung fortsetzt.

Das Wichtigste ist übrigens meiner Ansicht nach nicht, ob die Leukocyten bei Abwesenheit von Komplement die Choleravibrionen auflösen können, sondern ob sie auch ohne Mithilfe des bakteriolytischen Immunkörpers des Serums imstande sind, die Vibrionen zu vernichten. Bei gegen gewisse Krankheitserreger immun gemachten Tieren besorgen die Leukocyten unzweifelhaft die Keimvernichtung. Als Beispiel nenne ich Milzbrandimmunität bei mehreren Tieren, sowie die Streptokokkenimmunität beim Kaninchen. Es ist in diesen Fällen, soviel ich weiß, nie gelungen, eine Neubildung bakteriolytischer Immunkörper während der Immunisierung nachzuweisen, ja das Streptokokkenimmunserum von Kaninchen und gewisse Milzbrandimmunsera enthalten überhaupt keinen solchen. Die Leukocyten enthalten dagegen leicht nachweisbare keimtötende Substanzen. Die bakterizide Wirkung vom Blute des Hundes auf Milzbrandbacillen steht sogar in fast direkter Beziehung zu seinem Gehalt an Leukocyten. Bei der Immunität gegen Cholera und Typhus sind die Verhältnisse, wie bekannt, vollständig umgekehrt. Die bakteriolytische Immunität muß folglich in zwei Gruppen geteilt werden. Bei der einen wird die Bakterienvernichtung durch die Leukocyten besorgt. In der zweiten Gruppe verdanken die Tiere ihre keimvernichtende Kraft den bakteriolytischen Substanzen der Körpersäfte. Die Leukocyten wirken dann beim Vernichten der Krankheitserreger nur indirekterweise mit. Bei Beseitigung der Giftstoffe sind sie dagegen von allergrößter Bedeutung.

Aus den mitgeteilten Untersuchungen geht folgendes hervor.

Bei intraperitonealer Infektion des Meerschweinchens mit Choleravibrionen werden weit größere Dosen Vibrionen vertragen, wenn die Bauchhöhle Leukocyten enthält.

Die vollständige Abtötung der Vibrionen hört aber bei einer gewissen Menge auf, auch wenn die Leukocyten in großer Menge anwesend sind.

Getötete Vibrionen können dagegen in weit größerer Menge eingeführt werden.

Die leukocytenreiche Bauchhöhle ist viel reicher an Komplement als die normale, sowohl vor der Infektion, als während ihrer Bekämpfung.

Literatur.

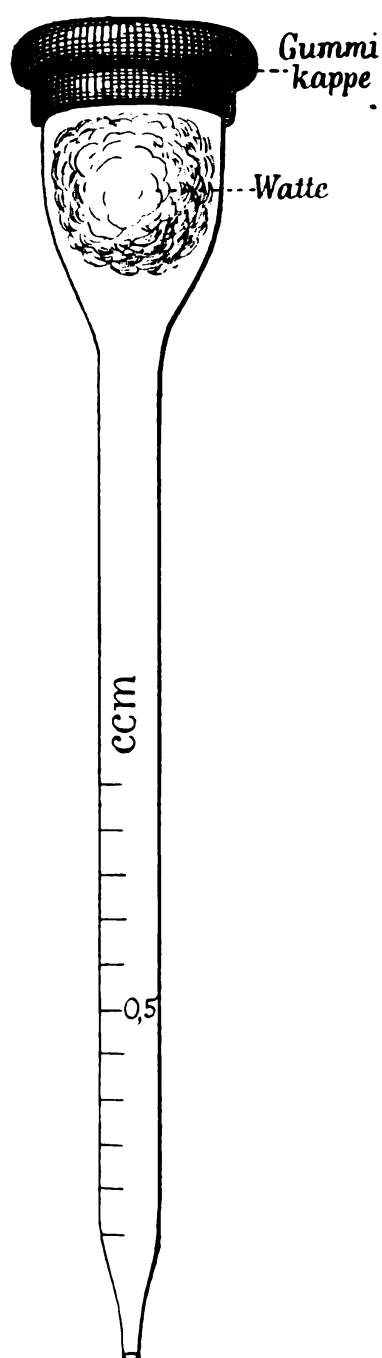
- 1) Hahn, M., Arch. f. Hyg. Bd. XXV.
- 2) Schattenfroh, A., Arch. f. Hyg. Bd. XXXI u. XXXV.
- 3) Denys et Leclef, La cellule. 1905.
- 4) Pettersson, A., Dieses Centralbl. Abt. I. Orig. Bd. XXXIX, XLV u. XLVI. — Zeitschr. f. klin. Med. Bd. LXIII. — Zeitschr. f. Immunitätsforschung etc. Bd. I.
- 5) Gruber u. Futaki, Münch. med. Wochenschr. 1907. p. 249.
- 6) Schneider, Rudolf, Münch. med. Wochenschr. 1908. p. 499.
- 7) Pettersson, A., Dieses Centralbl. Abt. I. Orig. Bd. XL u. XLII.
- 8) Korschun, C. V., Ann. Pasteur. 1908.
- 9) Weil, E., Dieses Centralbl. Abt. I. Orig. Bd. XLIII.

Nachdruck verboten.

Eine praktische Pipette für Serodiagnostik und Bakterienzüchtung.

Von Prof. Dr. Th. Kitt in München.

Mit 1 Figur.



Die gewöhnlichen Glaspipetten in Kapillarform ohne und mit Graduierung, wie sie zu Agglutinations-, Präzipitations- und Oponinversuchen dienen, werden meist in der Art gebraucht, daß man mit dem Munde daran saugt und mehr oder weniger krampfhaft mit dem Finger die obere Oeffnung zuhält, oder es wird mit länglichem Gummihütchen oder rundlichem Druckballon die Flüssigkeitsabgabe betätigt.

Das Saugen mit dem Munde macht in bakteriologischen Instituten, wenngleich Sterilisation als selbstverständlich gilt, keinen vollkommen guten Eindruck, weil zufällige Verunreinigungen doch nicht ausgeschlossen sind, die länglichen oder kugelförmigen Gummikappen, welche an Mikroskopierpipettenfläschchen ganz brauchbar sind, lassen bezüglich feinerer Dosierung zu wünschen übrig, indem der Gummi jeweils einknickt, der Druck nicht exakt regulierbar ist und die Finger ermüdet. Da einige neuere Konstruktionen von Pipetten ein ziemlich kompliziertes Aussehen haben und noch in den neuesten Lehrbüchern (z. B. in dem Handbuche von Kraus und Levaditi) nur die vorerwähnten gewöhnlichen Pipetten beschrieben sind, teile ich hier die Zeichnung einer außerordentlich einfachen praktischen Pipette mit, auf deren Herstellungsidee ich in Erinnerung an die drolligen karthesianischen Taucher, bei welchen eine breit ausgespannte Schweinsblase den Druck bewirkt, gekommen bin. Diese Pipette funktioniert sehr exakt, besonders zum Abmessen jener kleinen Flüssigkeitsquantitäten, die bei den biologischen Methoden in Betracht kommen, und gibt auf den leisesten Fingerdruck Ausschlag.

Die Sache ist einfach die, daß das obere Ende des als Kapillar oder zur geraden, kalibrierten, etwa 0,5 cm weiten Röhre geformten Glases becherförmig

in dem Durchmesser eines Reagensglases mit etwas umgebogenem Rande ausgestaltet wird.

Auf das becherförmige Ende spannt man eine gewöhnliche flache Reagensglaskappe (Flaschenkappe), die aber fest anschließen muß, eventuell ist sie am Glase durch Umwickeln mit einem Bindfaden zu befestigen. Wo es darauf ankommt, steril zu arbeiten, steckt man in die Höhlung des becherförmigen Teiles ein Wattebäuschchen, sterilisiert im Heißluftkasten und setzt dann erst die Gummikappe auf oder man sterilisiert das ganze montierte Rohr im Dampf.

Die Handhabung ergibt sich von selbst, wie bei den anderen mit Gummihütchen versehenen Pipetten, indem man mit Daumen und Mittelfinger das Rohr faßt und mit dem Zeigefinger auf die Gummiplatte tippt. Wenn man mehr als 1 ccm Flüssigkeit in die Röhre steigen lassen will, muß man natürlich die Gummiplatte entsprechend tief in die Höhlung eindrücken, um genügend Luft auszutreiben. Bei Senkrechthaltung und wenn die Kapillare unten etwas spitz ist, steht die eingesogene Flüssigkeitssäule absolut fest, und man kann haargenau jeden Teilstrich der Skala, ganze und halbe Tropfen, herausmessen. Bei Schiefhaltung können natürlich Luftblasen eintreten, wie das bei Opsoninversuchen absichtlich zur Schichtentrennung gemacht wird.

Der platte Gummiverschluß ist mir ferner namentlich für die längeren dünn Glasigen Kapillarpipetten handlich erschienen, mit denen man zum Ausstechen und Umzüchten anaërober Bakterien gut arbeitet, besser als mit dem Platindraht, weil man hier nicht bloß ein Tröpfchen, sondern größere Mengen transferieren will, z. B. zum Umzüchten von Rauschbrand-Blutbouillonkulturen, die dann viel üppiger wachsen, als wenn mit der Oese nur wenige Keime überpflanzt werden.

Pipetten der beschriebenen Form (D. R. G. M. angemeldet) sind bei F. & M. Lautenschläger, Berlin, München und Filialen erhältlich.

Inhalt.

- Bertarelli, E. und Bocchia, J.**, Ueber die Sterilisierung des Catguts, p. 620.
- Jaffé, J.**, Formveränderungen bei Trypanosomen der Nagana, p. 610.
- Kitt, Th.**, Eine praktische Pipette für Serodiagnostik und Bakterienzüchtung, p. 646.
- Krompecher, E., Goldzieher, M. und Augyán, J.**, Protozoonbefunde bei Typhus exanthematicus, p. 612.
- Leon, N.**, Deux bothriocéphales monstrueux, p. 616.
- Paranhos, Ulysses**, Ein neuer hämophiler Bacillus, gefunden bei einem Falle von Meningitis spinalis, p. 607.
- Pettersson, Alfred**, Ueber die Wirkung der Leukocyten bei intraperitonealer Cholerainfektion des Meerschweinchens, p. 634.
- Sauerbeck, Ernst**, Ueber das Bacterium coli mutabile (Massini) und Coli-Varietäten überhaupt, p. 572.
- Savini, Emil und Savini-Castano, Theres**, Beitrag zur experimentellen Biologie des z-Bacillus und seine Beziehungen zum Keuchhusten, p. 582.
- Taddei, Domenico**, Beitrag zum Studium der Morphologie des Streptococcus, p. 561.

Die Redaktion des „Centralblatts für Bakteriologie und Parasitenkunde“ richtet an die Herren Mitarbeiter die ergebene Bitte, etwaige Wünsche um Lieferung von besonderen Abdrücken ihrer Aufsätze entweder bei der Einsendung der Abhandlungen an die Redaktion auf das Manuskript schreiben zu wollen oder spätestens nach Empfang der ersten Korrekturabzüge direkt an den Verleger, Herrn Gustav Fischer in Jena, gelangen zu lassen.

Frommannsche Buchdruckerei (Hermann Pohle) in Jena.

Inhaltsverzeichnis.

I. Verzeichnis der in Band L enthaltenen Arbeiten.

- Adamoff, A. s. Podwysozki, W.**
Augyán, J. s. Krompecher, E.
Barannikoff, Johannes, Zur Technik der Versilberung von *Spirochaete pallida* (Schaudinn-Hoffmann). 263
Barrenscheen, Hermann, Ueber die Agglutination der Choleravibrionen. 261
Berghaus, W., Ueber die Beziehungen des Antitoxingehaltes des Diphtherieserums zu seinem Heilwert. III. Mitteilung. 87
Bernstein, Eugene P., Some preliminary studies on the growth of the typhoid and the colon bacillus on media containing blood and carbo-hydrates. 1
Bertarelli, E., Beitrag zur Aetiologie der Windpocken. 181
— und **Bocchia, J.,** Ueber die Sterilisierung des Catguts. Erste Mitteilung. 620
— und **Cecchetto, E.,** Weitere Untersuchungen über die Aetiologie des Trachoms. 36
Bezzola, Carlo, Ueber die bakteriolytischen Eigenschaften des Paratyphus-B-Immunserrums. 541
—, Sind die Hämolysine und die Cytopropine (Neufeld) verschiedene Substanzen? 522
—, Können die Muskeln als Bildungsstätte der Antikörper betrachtet werden? 519
Bocchia, I. s. Bertarelli, E.
Bocchia, Icilio, Ueber die desinfizierende Kraft des absoluten Amylalkohols im kochenden und im Dampfzustande. 469
—, Die Pyocyanase. 220
Börnstein, Felix, Ueber Anaphylaxie durch Fütterung gegenüber Fütterung. 374
Brekle, Untersuchungen betreffend die Erzielung von Keimfreiheit bei milzbrandsporenhaltigen Fellen und Häuten. 101
Caracciolo, Rosario s. Gabbl, Umberto.
Cecchetto, E. s. Bertarelli, E.
Crescenzi, Giulio, Ueber den Einfluß der Agglutination auf die kulturellen, agglutinierenden und bakteriolytischen Eigenschaften des Typhusbacillus. 81
Debenedetti s. Pugliese.
Dieudonné, A., Blutalkaliagar, ein Elektivnährboden für Choleravibrionen. 107
Doepner, Ueber den Wert des Kindborgschen Säurefuchsinagars für die Typhusdiagnose. 552
Eysell, Adolf, Erwiderung auf „Zur Frage der Eier von *Culex cantans*. Antwort etc. von B. Galli-Valerio und J. Rochaz de Jongh.“ 203
Ferri, Claudio, Ueber die Verteilung des Lyssavirus im Nervensystem. 438
—, Ueber die antitryptische Wirkung verschiedener Tiergewebe und Tialbuminoide. II. Mitteilung. 225
Ferrara, Vincenzo, Ueber das antigene Vermögen des Typhusbacillus sowohl in künstlicher als auch in natürlicher Kultur. Experimentelle Untersuchungen. 209
Fontes, A., Ueber eine in den tuberkulösen Lymphdrüsen vorhandene Tuberkelbacillen tötende Substanz. Vorläufige Mitteilung. 78
Gabbl, Umberto und Caracciolo, Rosario, Kala-Azar in Sizilien und Kalabrien. 424
Galli-Valerio, Bruno, Recherches sur la spirochétiase des poules de Tunisie et sur son agent de transmission: *Argas persicus* Fischer. 189
—, Recherches expérimentales sur la rage des rats. III^{ème} Mémoire. 318
Gasis, Demetrius, Ueber eine neue Reaktion der Tuberkelbazillen und eine darauf begründete differentialdiagnostische Färbungsmethode derselben. 111
Gellinger, H., Ueber einen eigenartigen, paratyphusähnlichen, Gelatine langsam verflüssigenden Bacillus bei einer Furunculosis nach fraglicher Infektion mit Loefflerschem Mäusetyphus. 497
Goldzieher, M. s. Krompecher, E.
Grüter, Wilhelm, Die Methämoglobinbildung in bluthaltigen Nährböden durch Streptokokken. 241
Hadley, Phillip B., Studies in avian coccidiosis. I. White diarrhea of chicks. II. Roup of fowls. 348
Hart, Carl, Ueber die Herstellung der Bakteriennährböden aus künstlichen Bouillonpräparaten. 494
Heimstädt, Oscar, Apparat zur Dunkel-feldbeleuchtung und für Ultramikroskopie. 283
Hofer, P. A., Einige Beobachtungen an *Spirochaete recurrentis* (Obermeieri). Bemerkungen zu der Arbeit von Dr. Richard Gonder: „Die Stellung der Spirochäten unter den Protisten“ in Bd. XLIX, Heft 2 des Centralbl. f. Bakt. etc. 345
Huntemüller, Der Dieudonné'sche Blut-Alkali-Agar. 109
Jaffe, J., Formveränderungen bei Trypanosomen der Nagana. 610
Kitt, Th., Eine praktische Pipette für Serodiagnostik und Bakterienzüchtung. 646

- Klimentko, W. N.**, Morphologie und Biologie des Keuchhustenbacillus. 305
- König, H.**, Zur Frage der Fleischvergiftungen durch den *Bacillus paratyphi* B. 129
- Kregenow, Curt**, Ueber die Filtration des Staupekontagiums. 326
- Krompecher, E., Goldzieher, M. und Augyán, J.**, Protozoonbefunde bei *Typhus exanthematicus*. 612
- Küster, E.**, Untersuchungen über Phenostal (Karbolsäuretablett) und seine keimtötende Wirkung. 233
- Küster, E.**, Vorrichtung zur genauen Abmessung, Mischung und Injektion kleinster Flüssigkeitsmengen. 490
- Kulakowsky, B.**, Ueber die Wirkung des Magen- und Darmsaftes auf *Pyocyanase*. 215
- Kulescha, G. S.**, Ein Fall von *Cholera asiatica* mit vorherrschender Affektion der Leber und der Gallengänge. 417
- Lebram, Fritz**, *Ratinbacillus* und *Bacillus enteritidis* Gärtner. 315
- Leon, N.**, Deux bothriocéphales monstrueux. 616
- Lischowetzki, M.**, Die Einwirkung des Sublimats und der Karbolsäure auf den *Typhusbacillus*, den *Cholera vibrio* und einige andere bewegliche Bakterien. 473
- v. Linstow**, Neue Helminthen aus Deutsch-Südwest-Afrika. 448
- Lipschütz, B.**, Antwort auf die Bemerkungen des Herrn Prof. Babes im Centralblatt für Bakteriologie Bd. XLVIII, Heft 5. 178
- Livierato, Spiro**, Ueber die Aetiologie des Scharlachs. Biologische Untersuchungen zur Kenntnis desselben. 422
- Marmann**, Ein neues Verfahren zum quantitativen Nachweis des *Bacterium coli* in Wasser, zugleich ein Beitrag zum Verhalten dieses Keimes in Flüssen und Schwimmbassins. 267
- Mayer, Georg**, Nachtrag zu der Arbeit: Untersuchungen über die Genickstarre in der Garnison Würzburg. 287
- Michailow, Sergius**, Zur Frage über die Veränderungen des Nervensystems bei der asiatischen Cholera beim Menschen. 296
- Morelli, G.**, Ueber ein neues Verfahren zum Nachweis von Indol auf Nährsubstraten. 413
- Münden, Max**, Eine wichtige bakteriologische Aufgabe. 206
- Muller, Leon**, De l'influence de l'opothérapie thyroïdienne et du traitement iodé sur le pouvoir hémolytique du sérum. 462
- Nägler, K.**, Eine neue Spirochäte aus dem Süßwasser. 445
- Neri, Filippo**, Le diagnostic rapide de la rage. Nouvelle méthode de coloration des corps de Negri. 409
- Noda, Saburo**, Ueber das Mischungsverhältnis bei hämolytischen Proben. 401
- Panichi, Luigi und Porri, Giulio**, Ueber die Biologie des *Pneumococcus* von Fraenkel. 139
- Paranhos, Ulysses**, Ein neuer hämophiler *Bacillus*, gefunden bei einem Falle von Meningitis spinalis. 607
- Pettersson, Alfred**, Ueber die Wirkung der Leukocyten bei intraperitonealer Cholerainfektion des Meerschweinchens. 634
- Pfeiffer, R. und Ungermann, E.**, Zur Antitoxinfrage bei der Dysenterie. 534
- Podwysozki, W. und Adamoff, A.**, Ueber die verschiedene Wirkung der *Pyocyanase* auf Mikroben in festen und flüssigen Nährböden, sowie auf Virus und Vaccine des *Vibrio cholerae asiaticae*. 44
- Porri, Giulio s. Panichi, Luigi.**
- Pugliese und Debenedetti**, Experimentelle Untersuchungen über die Infektionsfähigkeit der Vaccinestoffe. 443
- Rach, E. und Reuss, A. v.**, Zur Aetiologie der Cystitis im Säuglingsalter (*Bacillus bifidus communis* und ein *Paracolibacillus*). 169
- Raubitschek, Hugo**, Bemerkungen zu dem Artikel von R. Emmerich und O. Löw „Zur Kenntnis der bakteriziden Eigenschaften der *Pyocyanase*“. 468
- Repetto, R.**, Experimentelle und histologische Beobachtungen über die Milch und die Amnionflüssigkeit eines an der Tollwut gestorbenen Schafes. 442
- Reuss, A. v. s. Rach, E.**
- Rodenwaldt, Ernst**, *Fasciolopsis Füllebornii* n. sp. 451
- Rommeler**, Ueber Befunde von *Paratyphusbacillen* in Fleischwaren. 501
- Rosenberger, Randle C.**, The presence of tubercle bacilli in the circulating blood in tuberculosis. 295
- Sacharoff, G. P.**, Ueber die Milzbrandimmunität des Hundes. 353
- Sauerbeck, Ernst**, Ueber das *Bacterium coli mutabile* (Massini) und *Coli-Varietäten* überhaupt. 572
- , *Sarcina mucosa* nova species? 289
- Saul, E.**, Untersuchungen zur Aetiologie und Biologie der Tumoren. IX. Mitteilung. 427
- Savini, Emil und Savini-Castano, Therese**, Beitrag zur experimentellen Biologie des *z-Bacillus* und seine Beziehungen zum Keuchhusten. Erste Mitteilung. 582
- Savini-Castano, Therese s. Savini, Emil.**
- Scheller, R.**, Ueber die Verbreitung der Influenzabacillen. Eine epidemiologische Studie. 503
- Schmidt, Th.**, Untersuchungen über Hämolyse bei *Coli-* und anderen Darmbakterien. 359
- van der Sluis, Y.**, Ueber die Abtötung der Tuberkelbacillen in natürlich infizierter Milch und über die Pasteurisierung der Milch. 378

- Stiekdorn, Walther, Beitrag zur Biologie des Rotlaufbacillus. 5
 Streng, Osv., Studien über das Verhalten des Rinderserums gegenüber den Mikroben. Versuch einer neuen serodiagnostischen Methode. 47
 Struett, Nic., Ursache des Todes bei dem akuten Milzbrande. 156
 Taddei, Domenleo, Beitrag zum Studium der Morphologie des Streptococcus. 561
 Terni, Camillo, Contribution à l'étude de la variole et du vaccin et des autres maladies similaires. 23
 Ungermann, E. s. Pfeiffer, R. 513
 Ungermann, E., Untersuchungen über Appendicitis. 513
 Vallillo, Giovanni, Das Vorkommen von *Ascaris mystax* beim Löwen. 461
 Vincenzi, Livio, Zur kulturellen Unterscheidung zweier Pseudotuberkulosebacillen (*Bacillus Pfeiffer* und *Bacillo opale agliaceo Vincenzi*) der Nagetiere. 2
 De Waele, Henri, Protéolase et antiprotéolase dans les cultures microbiennes. 40
 Zeuner, W., Spezifische Behandlung bei experimenteller Tuberkulose. 95

II. Sachverzeichnis.

- Abmessung kleinster Flüssigkeitsmengen, Vorrichtung. 490
 Acidum carbolicum s. Karbolsäure.
 Affe, Trachominfection. 36
 Agar, Blutalkali-, als Nährboden für Choleravibrien. 107. 109
 —, Säurefuchsin-, zur Typhusdiagnose. 552
 Agglutination des *Bac. typhi*, Wirkung auf seine kulturellen, agglutinatorischen und bakteriolytischen Eigenschaften. 81
 — der Bakterien durch Serum (Rinder-). 48
 — des *Vibrio cholerae*. 261
 Agglutinin und Konglutinin, Unterschied. 61
 Albuminoide, tierische, antitryptische Wirkung. 229
 Alkaliagar, Blut-, als Nährboden für Choleravibrien. 107. 109
 Alkalifestigkeit des *Bacillus tuberculosis*. 114
 Alkohol, Amyl-, Wirkung auf Bakterien. 469
 —, Wirkung auf Sporen. 469
 Amnionflüssigkeit eines an Wut gestorbenen Schafes, Untersuchung. 442
Amoeba meleagridis, Beziehung zu *Coccidium cuniculi*. 350
Anaemia splenica infantum s. a. Kala-Azar.
 — — —, Aetiologie und Vorkommen in Kalabrien und Sizilien. 424
 Anaphylaxie s. Ueberempfindlichkeit.
 Antikörper, Bildung in den Muskeln. 519
 Antiproteolase in Bakterienkulturen. 40
 Antitoxin gegen Dysenterie. 534
 — -Gehalt des Diphtherieserums, Beziehung zu seinem Heilwerte. 87
 Appendicitis, Aetiologie. 513
 —, Bakteriologie. 514
Argas persicus, Rolle bei der Spirochaetose der Hühner. 189
Ascaris mystax, Vorkommen beim Löwen. 461
 Auge, Hornhaut, Vaccineinfektion derselben. 444
 —, Linse, Ueberempfindlichkeit gegenüber derselben. 374
Bacillus anthracis-Sporen enthaltende Felle und Häute, Keimfreiheitserzielung. 101
Bacillus bifidus communis, Rolle bei der Cystitis. 169
 — *cacosmus*, Rolle beim Roup des Geflügels. 352
 — *coli*, hämolytische Wirkung. 359
 — —, Wachstum auf Blut und Kohlehydrat enthaltenden Medien. 1
 — —, Wirkung des Serums (Rinder-). 48
 — — *communis*-ähnlicher, Rolle bei der Cystitis. 169
 — — —, Wirkung der Pyocyanase. 45
 — *diphtheriae*, Wirkung der Pyocyanase. 45
 — — —, des Serums (Rinder-). 48
 — *dysenteriae*, Toxin. 534
 — *enteritidis* Gärtner, Beziehung zum *Ratibacillus*. 315
 —, hämoglobinophiler, n. sp., kulturelle und morphologische Eigenschaften. 609
 — —, Vorkommen bei Meningitis spinalis. 607
 — *influenzae*, Ursache der Influenza. 503
 — —, Verbreitung. 503
 —, Keuchhusten- (*Bordet-Gengou*), Biologie. 305
 — — —, morphologische und kulturelle Eigenschaften. 305
 —, *Paracoli*, Rolle bei der Cystitis. 169
 — *opalis agliaceus*, kulturelle Unterscheidung von *Bacillus pseudotuberculosis Pfeiffer*. 2
 — *paratyphi*-ähnlicher *Bacillus*, Eigenschaften. 498
 — — —, Ursache der Furunculosis. 497
 — —, Bakteriolyse durch *Paratyphus-Immunserum*. 541
 — —, Nachweis in Fleischwaren. 502
 — —, Ursache der Fleischvergiftung. 129. 501
 — —, Vorkommen in Fleischwaren. 501
 — *pertussis*, Wirkung des Serums (Rinder-). 48
 — *prodigiosus*, Vorkommen bei Furunculosis. 497
 — *pseudodiphtheriae*, Wirkung des Serums (Rinder-). 48

- Bacillus pseudotuberculosis* Pfeiffer, kulturelle Unterscheidung von *Bacillus opalis agliaceus*. 2
- *pyocyaneus* s. a. *Bacterium pyocyaneum*. — —, Wirkung der Karbolsäure. 488
- —, — von Sublimat. 479
- , Ratin-, Beziehung zu *Bacillus enteritidis* Gärtner. 315
- , Rotlauf-, Biologie. 5
- —, Mischinfektion mit *Bacterium coli communis*. 12
- —, Virulenz. 5
- , Smegma-, Differentialdiagnose von *Bacillus tuberculosis*. 114
- *subtilis*, Vorkommen bei Appendicitis. 515
- *tuberculosis*, Alkalifestigkeit. 114
- —, Differentialdiagnose. 111
- —, — von Smegmabacillen. 114
- —, Extrakt mittels Seife, zur Behandlung der Tuberkulose. 95
- —, Färbung, differential-diagnostische. 111
- —, granuläre Form, nach Ziehl nicht färbbar. 116
- —, Morphologie. 116. 124
- —, tötende Substanz in tuberkulösen Lymphdrüsen. 78
- —, Tötung in der Milch. 378
- —, Vorkommen in der Milch bei Tuberkulose. 388
- —, — im zirkulierenden Blute. 295
- —, Wirkung des Serums (Rinder-). 48
- —, — der Temperatur. 382
- *typhi*, antigenes Vermögen. 209
- —, Nachweis mittels Säurefuchsinagars. 552
- —, tierischer, Eigenschaften. 210
- —, Wachstum auf Blut und Kohlehydrate enthaltenden Medien. 1
- —, Wirkung der Agglutination auf seine Eigenschaften. 81
- —, — der Karbolsäure. 482
- —, — des Serums (Rinder-). 48
- —, — von Sublimat. 474
- — *murium*, Rolle bei der Furunculosis. 497
- *vulgatus*, Vorkommen bei Appendicitis. 514
- *z*-, Beziehung zum Keuchhusten. 582
- —, Biologie. 582
- Bacterium acidi lactici*, Vorkommen bei Appendicitis. 514
- — —, — im Blinddarme. 516
- *coli*, hämolytische Wirkung. 359
- —, Indikator fäkal. Verunreinigung des Wassers. 267
- —, quantitativer Nachweis im Wasser. 267
- —, Varietäten. 572
- —, Vorkommen bei Appendicitis. 514
- —, — im Blinddarme. 515. 516
- — *commune*, Mischinfektion mit *Rotlaufbacillus*. 12
- — *mutabile*, Untersuchungen. 572
- *faecale alcaligenes*, Vorkommen bei Appendicitis. 514. 516
- Bacterium pneumoniae* Friedländer, Vorkommen bei Appendicitis. 515
- *proteus*, Vorkommen im Blinddarme. 515. 516
- — *vulgare*, Vorkommen bei Appendicitis. 514
- *pseudodiphtheriticum*, Vorkommen bei Appendicitis. 514
- *pyocyaneum* s. a. *Bacillus pyocyaneus*. — —, hämolytische Wirkung. 372
- —, Vorkommen bei Appendicitis. 516
- *septicaemiae gallinarum*, Rolle bei der Diarrhöe der Hühner. 349. 353
- Bakterien, Agglutination durch Serum (Rinder-). 48
- , Darm-, hämolytische Wirkung. 359
- , Enzyme derselben. 40
- , hämolytische Wirkung. 359
- , Indolbildung, Nachweis derselben. 413
- , Involutionsformen. 561
- , Konglutination durch Serum. 50
- -Kultur, Pipette für dieselbe. 646
- —, Proteolase und Antiproteolase in derselben. 40
- , Morphologie. 561
- , Pseudotuberkulose-, kulturelle Unterscheidung. 2
- , Rolle bei den Infektionskrankheiten. 206
- , Vorkommen bei der Appendicitis. 514
- , Wirkung des Amylalkohols. 469
- , — des Kaffees. 566
- — der Karbolsäure. 481
- — der Karbolsäuretablettchen. 233
- , — des Lithiumchlorids. 566
- — des Phenostals. 233
- — der Pyozyanase. 44. 221. 468
- , Wirkung des Serums von Rindern. 47
- — des Sublimates. 473
- — der Temperatur. 382
- Bakterienflora des Blinddarmes. 515. 516
- Bakteriolyse durch Paratyphus-Immunsérum. 541
- Bakteriolyse und Bakteriotropine, Verschiedenheit. 522. 541
- Bakteriotropine und Bakteriolyse, Verschiedenheit. 522. 541
- , Untersuchungen. 522. 541
- Blinddarm, Bakterienflora. 515. 516
- Blut enthaltende Nährböden, Methämoglobinbildung durch Streptokokken in denselben. 241
- enthaltende Nährböden, Wachstum des *Bacillus typhi* und *Bacillus coli*. 1
- Blutalkaliagar als Elektivnährboden für Choleravibrionen. 107. 109
- Blut-Haptine, Untersuchung. 401
- Blut, Vorkommen des *Bacillus tuberculosis* im zirkulierenden. 295
- Bothriocephalus latus*, Abnormitäten. 616
- Bouillonpräparate, künstliche, zur Herstellung von Nährböden. 494
- Catgut, Sterilisierung. 620
- Cholera, Antikörperbildung in den Muskeln. 520
- mit vorherrschender Affektion der Leber und Gallengänge. 417

- Cholera-Infektion, intraperitoneale, des Meerschweinchens, Wirkung der Leukozyten. 634
 —, Nervensystemveränderungen bei derselben. 296
 Chthonoblast, Untersuchung. 206
 Coccidien, Rolle bei der Geschwulstbildung. 433
 Coccidiosis der Vögel, Untersuchungen. 348
 Coccidium oviforme, Morphologie, Entwicklung. 427
 — cuniculi, Beziehung zu Amoeba meleagridis. 350
 — —, Ursache des Roup der Hühner. 352
 — —, — der weißen Diarrhöe der Hühner. 348
 — muris, Morphologie, Entwicklung. 430
 Coli-Bakterien, hämolytische Wirkung. 359
 — Sepsis, Untersuchung. 372
 Culex cantans, Eier. 203
 Cynictis penicillata, Wirt von Heterakis Schebeni. 448
 Cysticercus fasciolaris, Morphologie. 435
 — —, Rolle bei der Geschwulstbildung. 433
 — pisiformis, Morphologie. 434
 Cystitis, Rolle des Bacillus bifidus communis. 169
 —, Rolle eines Paracolibacillus. 169
 Cytorrhyses vaccinia, Untersuchung. 23
 — variolae, Untersuchung. 23
 Cytotropine und Hämolsine, Verschiedenheit. 522. 541
 Darm, Blind- s. Blinddarm.
 Darmbakterien, hämolytische Wirkung. 359
 Darmsaft, Wirkung auf Pyozyanase. 218
 Darmwürmer, antitryptische Wirkung. 225
 Desinfektion mittels Amylalkohols. 469
 — mit Phenostal. 233
 Diarrhöe, weiße, der Hühner durch Bacterium septicaemiae gallinarum verursacht. 349. 353
 — —, der Hühner, durch Coccidium cuniculi verursacht. 348
 Diphenyloxalester s. Phenostal.
 Diphtherie-Serum, Antitoxingehalt, Beziehung desselben zum Heilwerte. 87
 Diplococcus lanceolatus, Vorkommen bei Appendicitis. 514
 Dunkelfeldbeleuchtung, Apparat. 283
 Dysenterie, Antitoxinfrage. 534
 —, Immunisierung mit Serum. 535
 Eier von Culex cantans. 203
 Eiweiß, Linsen-, Ueberempfindlichkeit gegenüber demselben. 374
 Elektivnährboden für Vibrio cholerae (Blutalkaliagar). 107. 109
 Enzyme in Bakterienkulturen. 40
 —, proteolytische, in Bakterienkulturen. 40
 Equus caballus, Wirt von Oxyuris curvula. 451
 Färbung des Bacillus tuberculosis. 111
 — der Negrischen Körper. 409
 — der Spirochaete pallida. 263
 Fasciolopsis Füllebornii n. sp., Anatomie. 451
 Fell, milzbrandsporenhaltiges, Keimfreiheitzielung. 101
 Fleischvergiftung, durch Bacillus paratyphi verursacht. 129. 501
 Fleischwaren, Vorkommen des Bacillus paratyphi. 501
 Flüssigkeit, Amnion- s. Amnionflüssigkeit.
 Flüssigkeitsmengen, kleinste, Apparat zur Abmessung, Mischung und Injektion. 490
 Fluß, Vorkommen des Bacterium coli. 267
 Francolinus adspersus, Wirt von Heterakis poculum. 449
 — —, Wirt von Physaloptera brevicauda. 449
 Fremdkörper, Rolle bei der Appendicitis. 517
 Fuchsinagar, Säure- zur Typhusdiagnose. 552
 Fütterung, Ueberempfindlichkeit durch Fütterung gegenüber Fütterung. 374
 Furunculosis, durch Bacillus paratyphi-ähnlichen Bac. verursacht. 497
 —, Rolle des Bacillus typhi murium. 497
 Gallengang-Affektion bei Cholera. 417
 Geflügel, Roup, Rolle des Coccidium cuniculi. 352
 Geschwülste, Aetiologie und Biologie. 427
 —, Rolle der Coccidien. 433
 — — des Cysticercus fasciolaris. 433
 Gewebe, tierische, antitryptische Wirkung. 225
 Hämolyse durch Bacterium pyocyaneum. 372
 — durch Bakterien. 359
 — durch Colibakterien. 359
 — bei Erythrocytenüberschuß. 401
 — bei wechselnder Immunkörperkonzentration und -menge. 404
 —, Mischungsverhältnis bei hämolytischen Proben. 401
 — durch Serum, Wirkung der Jodtherapie. 466
 — durch Serum, Wirkung der Thyroidea-Therapie. 462
 — durch Streptokokken. 241. 371
 Hämolsine und Cytotropine, Verschiedenheit. 522. 541
 Hämotropine, Untersuchungen. 523
 Haptine, Blut-, Untersuchung. 401
 Haut, milzbrandsporenhaltige, Keimfreiheitzielung. 101
 Heilwert des Diphtherie-Serums, Beziehung zum Antitoxingehalt. 87
 Helminthen, neue, aus Deutsch-Südwest-Afrika. 448
 Heterakis poculum n. sp., Anatomie, Vorkommen, Wirt. 449
 — Schebeni n. sp., Anatomie, Vorkommen, Wirt. 448
 Hirn, Veränderungen bei Cholera. 301
 —, Vorkommen von Wut-Virus. 439
 Hornhaut, Vaccineinfektion. 444
 Huhn, Diarrhöe, weiße, durch Bacterium septicaemiae gallinarum verursacht. 349. 353
 —, —, —, Rolle des Coccidium cuniculi. 348

Huhn, Roup, Rolle des <i>Coccidium cuniculi</i> .	352	Maul- und Klauenseuche, Untersuchungen.	27. 33
—, Spirochaetosis.	189	Meerschweinchen, Wut.	322
Hund, Milzbrandimmunität.	353	Meningitis cerebrospinalis, Vorkommen in der Garnison Würzburg.	287
Immunisierung gegen Dysenterie mit Serum.	535	— spinalis, Vorkommen eines hämoglobophilen Bacillus.	607
— gegen Wut.	441	Messung kleinster Flüssigkeitsmengen, Vorrichtung.	490
Immunität, Milzbrand- des Hundes.	353	Methämoglobin, Bildung durch <i>Pneumococcus</i> .	248
Immunserum, Paratyphus-, bakteriolytische Eigenschaften.	541	—, — durch <i>Streptococcus lanceolatus</i> .	248
Indol, Nachweis in und auf Nährböden.	413	—, — durch <i>Streptococcus longus</i> .	253
Infektionskrankheiten, Rolle der Bakterien.	206	—, — durch <i>Streptococcus mucosus</i> .	256
Influenza, durch <i>Bacillus influenza</i> verursacht.	503	—, — durch <i>Streptococcus viridans</i> .	251
—, Epidemiologie.	503	—, — durch Streptokokken in bluthaltigen Nährböden.	241
Injektion kleinster Flüssigkeitsmengen.	490	Mikroskopie, Ultra- s. Ultramikroskopie.	
Jod, Wirkung auf die Hämolyse durch Serum.	466	Milch, Pasteurisieren.	378
Jodipin, Wirkung auf die Hämolyse durch Serum.	466	—, Tötung der Tuberkelbacillen in derselben.	378
Kaffein, Wirkung auf Streptokokken.	566	—, Vorkommen von <i>Bacillus tuberculosis</i> bei Tuberkulose.	388
Kala-Azar s. a. <i>Anaemia splenica infantum</i> .		— eines an Wut gestorbenen Schafes, Untersuchung.	442
—, Aetiologie.	426	Milzbrand-Immunität des Hundes.	353
—, durch <i>Leishmania donovani</i> verursacht.	427	— -Sporen enthaltende Felle und Häute, Keimfreiheitszielung.	101
—, Vorkommen in Kalabrien.)	424	—, Todesursache.	156
—, — in Sizilien.	424	Mischung kleinster Flüssigkeitsmengen, Vorrichtung.	490
Kaninchen, Vaccineinfektion der Hornhaut.	444	Mischungsverhältnis bei hämolytischen Proben.	401
—, Wut.	319	Muriden, Wut.	318
Karbolsäure, Wirkung auf <i>Bacillus pyocyaneus</i> .	488	Mus rattus, Wut.	318
—, — auf <i>Bacillus typhi</i> .	482	Muskeln als Antikörperbildungsstätte.	519
—, — auf Bakterien.	481	Nährboden, Elektiv- für <i>Vibrio cholerae</i> (Blutalkaliagar).	107. 109
—, — auf <i>Vibrio cholerae</i> .	485	—, Herstellung aus künstlichen Bouillonpräparaten.	494
—, — auf <i>Vibrio Metschnikowi</i> .	488	—, Indolnachweis in und auf demselben.	413
—, — auf <i>Vibrio Prior-Finkleri</i> .	488	Nagana-Trypanosomen s. <i>Trypanosoma brucei</i> .	
Karbolsäuretablettten s. a. Phenostal.		Nervensystem, Veränderungen bei Cholera.	296
—, Wirkung auf Bakterien.	233	—, Verteilung des Wut-Virus in demselben.	438
Kern der Spirochaeten.	345	Opsonine, Untersuchungen.	522
Keuchhusten, Aetiologie.	582	<i>Oxyuris curvula</i> , Vorkommen bei <i>Equus caballus</i> .	451
— - <i>Bacillus</i> s. <i>Bacillus</i> , Keuchhusten-.		— polyoon n. sp., Anatomie, Vorkommen, Wirt.	450
Körper, Negrische, Färbung.	409	Paratyphus-Immunserum, bakteriolytische Eigenschaften.	541
Kohlehydrat enthaltende Nährböden, Wachstum des <i>Bacillus typhi</i> und <i>Bacillus coli</i> .	1	Pferd, Wirt von <i>Oxyuris curvula</i> .	451
Konglutination der Bakterien durch Serum (Rinder-).	50	Phenostal s. a. Karbolsäuretablettten.	
— zur Serumdiagnose.	65	—, Wirkung auf Bakterien.	233
— und Agglutination, Unterschied.	61	Physaloptera brevicauda n. sp., Anatomie, Vorkommen, Wirt.	449
Leber-Affektion bei Cholera.	417	Pipette für Bakterienzüchtung und Serodiagnostik.	646
Leber, Vorkommen von <i>Vibrio cholerae</i> .	419	<i>Pneumococcus</i> , Methämoglobinbildung.	248
<i>Leishmania donovani</i> , Ursache der Kala-Azar.	427	— Fraenkel, Biologie.	139
Leukozyten, Wirkung bei intraperitonealer Cholera-Infektion des Meerschweinchens.	634	—, Virulenz.	139
Linsen-Eiweiß, Ueberempfindlichkeit gegenüber demselben.	374		
Lithiumchlorid, Wirkung auf Streptokokken.	566		
Löwe, Wirt von <i>Ascaris mystax</i> .	461		
Lymphdrüsen, tuberkulöse, Tuberkelbacillen tötende Substanzen in denselben.	78		
Magensaft, Wirkung der Pyocyanase.	215		

- Pocken s. Variola.**
Pocken, Schaf- s. Schafpocken.
Proteolase in Bakterienkulturen. 40
Protisten, Stellung der Spirochäten unter denselben. 345
Protozoon, Vorkommen bei Typhus exanthematicus. 612
Pyozyanase, bakterizide Eigenschaften (Natur des wirksamen Körpers). 468
 —, Untersuchungen. 220
 —, Wirkung auf *Bacillus coli commune*. 45
 —, — auf *Bacillus diphtheriae*. 45
 —, — auf Bakterien. 44. 221. 468
 —, — des Darmsaftes. 218
 —, — des Magensaftes. 215
 —, — des Trypsins. 217
 —, — auf *Vibrio cholerae*. 44
Ratinbacillus, Beziehung zu *Bacillus enteritidis* Gärtner. 315
Ratte, Wut. 318
Rinder-Serum, Wirkung auf Bakterien. 47
Rotlaufbacillus s. *Bacillus*, Rotlauf-.
Roup der Hühner, Rolle des *Coccidium cuculii*. 352
Rückenmark, Veränderung bei Cholera. 300
 —, Vorkommen von Wut-Virus. 439
Säurefuchsinagar zur Typhusdiagnose. 552
Saft, Darm- s. Darmsaft.
Saft, Magen- s. Magensaft.
***Sarcina*-Arten, Vorkommen im Blinddarme.** 515. 516
***Sarcina flava*, Vorkommen bei Appendicitis.** 514
 — *mucosa* n. sp., kulturelle und morphologische Eigenschaften. 289
 — — —, Pathogenität. 292
Schaf, Wirt von *Stilesia hepatica*. 451
 —, Wut. 442
Schafpocken, Untersuchungen. 27. 33
Scharlach, Aetiologie. 422
Schilddrüse s. Thyreoidea.
Schwimmbassin, Vorkommen des *Bacterium coli*. 277
Seife zur Behandlung der Tuberkulose. 95
Sepsis, durch Colibakterien verursacht. 372
Serodiagnostik, neue Methode. 47
Serum, Agglutination der Bakterien. 48
 —, hämolytische Wirkung, Einfluß der Jodtherapie. 466
 —, — —, Einfluß der Thyreoidea-Therapie. 462
 —, Konglutination der Bakterien. 50
 —, Paratyphus-Immun-, bakteriolytische Eigenschaften. 541
 —, Wirkung auf Bakterien. 47
Serumdiagnose mittels Konglutination. 65
Serumdiagnostik, Pipette für dieselbe. 646
***Spirochaete flexibilis* n. sp., Morphologie.** 445
 — *obermeieri*, Struktur. 345
 — —, Teilung. 345
 — *pallida*, Färbung. 263
 — —, Silberimprägnation. 263
Spirochäten, Kern. 345
 —, Morphologie. 345
Spirochäten, Stellung unter den Protisten. 345
***Spirochaetosis* der Hühner, Rolle des *Argas persicus*.** 189
Sporen, Wirkung des Amylalkohols. 469
***Staphylococcus pyogenes albus*, Vorkommen bei Appendicitis.** 514
 — — —, — im Blinddarme. 515
 — — *aureus*, Vorkommen bei Appendicitis. 514
 — — —, — im Blinddarme. 516
 — — —, Wirkung des Serums (Rinder-). 48
Staphylokokken, Vorkommen bei Appendicitis. 514
Staupe-Erreger, Filtrierbarkeit. 326
Sterilisierung des Catguts. 620
***Stilesia hepatica*, Vorkommen bei *Ovis aries* und *Capra hircus*.** 451
***Streptococcus choreae*, Morphologie.** 563
 — *erysipelatis*, Morphologie. 563
 — *lanceolatus*, Methämoglobinbildung. 248
 — *longus*, Methämoglobinbildung. 253
 — —, Vorkommen bei Appendicitis. 514
 — *mitior*, hämolytische Wirkung. 371
 — *mucosus*, Methämoglobinbildung. 256
 — *pyogenes*, Morphologie. 563
 — —, Rolle beim Scharlach. 423
 — —, Vorkommen bei Appendicitis. 514
 — —, Wirkung des Serums (Rinder-). 48
 — *viridans*, Methämoglobinbildung. 251
Streptokokken, hämolytische Wirkung. 241. 371
 —, Methämoglobinbildung in bluthaltigen Nährböden. 241
 —, Vorkommen bei Appendicitis. 514
 —, Wirkung des Kaffeins. 566
 —, — des Lithiumchlorids. 566
 —, — der Weinsteinsäure. 566
Sublimat, Wirkung auf *Bacillus pyocyaneus*. 479
 —, — auf *Bacillus typhi*. 474
 —, — auf Bakterien. 473
 —, — auf *Vibrio cholerae*. 478
 —, — auf *Vibrio Metschnikowi*. 479
 —, — auf *Vibrio Prior-Finkleri*. 479
***Taenia ovis*, antitryptische Wirkung.** 227
Temperatur, Wirkung auf Bakterien. 382
Thyreoidea-Extrakt, Wirkung auf die Hämolysen durch Serum. 462
Toxin des *Bacillus dysenteriae*. 534
Trachom, Aetiologie. 36
Trachomkörperchen, Untersuchungen. 37
***Trypanosoma brucei*, Formveränderungen.** 610
Trypsin, Wirkung auf Pyocyanae. 217
 —, — (antitryptische) von Albuminoiden. 229
 —, — — von Geweben. 225
 —, — — von Taenien. 227
Tuberkulose, Behandlung mittels Tuberkel-Bacillen-Extrakt durch Seife. 95
 —, Blut, Vorkommen des *Bacillus tuberculosis* im zirkulierenden. 295
 —, Rinder-, Vorkommen von *Bacillus tuberculosis* in der Milch. 388

Tuberkulose, in tuberkulösen Lymphdrüsen vorhandene Tuberkelbacillen tötende Substanz.	78	Virus, filtrierbare, mikroskopisch sichtbare.	178
Tumoren s. Geschwülste.		—, ultramikroskopisches, Rolle bei Infektionskrankheiten.	207
Typhus abdominalis, Diagnose mittels Säurefuchsinagars.	552	Vögel, Coccidiosis.	348
— exanthematicus, Protozoonfund.	612	Wasser, fäkale Verunreinigung, Nachweis mittels <i>Bacterium coli</i> .	267
Ueberempfindlichkeit durch Fütterung gegenüber Fütterung.	374	—, quantitativer Nachweis des <i>Bacterium coli</i> .	267
— gegenüber Linseneiweiß.	374	—, Veränderungen des <i>Vibrio cholerae</i> in demselben.	261
Ultramikroskopie, Apparat.	283	—, Vorkommen von <i>Bacterium coli</i> .	267
Vaccine, Erreger.	23	Weinsteinsäure, Wirkung auf Streptokokken.	506
—, Guarnierische Körperchen.	23	Windpocken s. Varicella.	
— -Infektion der Hornhaut.	444	Würmer, Darm-, antitryptische Wirkung.	227
— -Körperchen, Untersuchung.	23. 27	Wurst, Vorkommen des <i>Bacillus paratyphi</i> .	502
— -Stoffe, Infektionsfähigkeit.	443	Wut, Diagnose, Schnell-.	409
—, Untersuchungen.	23	—, Immunisierung.	441
Varicella, Aetiologie, Untersuchungen.	33. 181	— der Kaninchen.	319
Variola, Erreger.	23	— der Meerschweinchen.	322
—, Untersuchungen.	23	— der Muriden, experimentelle Untersuchungen.	318
<i>Vibrio cholerae</i> , Agglutination.	261	—, Negrische Körper, Färbung.	409
— —, Differentialdiagnose.	261	— der Ratten, experimentelle Untersuchungen.	318
— —, Nährboden (Blutalkaliagar).	107. 109	— beim Schafe.	442
— —, Veränderungen im Wasser.	261	Wut-Virus, Uebergang von Mutter auf Foetus.	443
— —, Verbreitung im Organismus.	300	— —, Verteilung im Nervensystem.	438
— —, Vorkommen in der Leber.	419	— —, Vorkommen in der Amnionflüssigkeit.	442
— —, Wirkung der Karbolsäure.	485	— —, Vorkommen in der Milch.	442
— —, — der Pyozyanase.	44	Xerus setosus, Wirt von <i>Oxyuris polyoon</i> .	450
— —, — des Serums (Rinder-).	48	Ziege, Wirt von <i>Stilesia hepatica</i> .	451
— —, — von Sublimat.	478		
— Metschnikowi, Wirkung der Karbolsäure.	488		
— —, — von Sublimat.	479		
— Prior-Finkleri, Wirkung der Karbolsäure.	488		
— —, — von Sublimat.	479		

III. Verzeichnis der Abbildungen.

Abmessung kleinster Flüssigkeitsmengen, Apparat.	492	Bothriocephalus latus, Abnormität.	618
Apparat zur Abmessung, Mischung und Injektion kleinster Flüssigkeitsmengen.	492	Cholera, Hirn- und Rückenmarkveränderungen.	300. 301
— zur Dunkelfeldbeleuchtung und Ultramikroskopie.	284. 286	Coccidium muris.	432
— zum Fixieren von Hühnern.	192	— oviforme, encystiert.	429
Argas persicus, Ei.	201	— —, reifes.	430—432
— —, Totalansicht.	201	— —, Sporen.	428
Bacillus, Keuchhusten- (Bordet-Gengou), Kultur. (Taf.)	315	Cysticercus fasciolaris, Kapsel.	436. 437
— opalis aglicaeus, Kolonie. (Taf.)	3. 4	— pisiformis, Morphologie.	434—436
— Pfeiffer, Kolonie. (Taf.)	4. 5	Cystitis, Harnsediment.	170
— pseudotuberculosis Pfeiffer, Kolonie. (Taf.)	4. 5	Distoma Rathouisi, Cirrusbeutel.	457
Bakterienzüchtung, Pipette für dieselbe.	646	Dunkelfeldbeleuchtung, Apparat.	284. 286
Befestigung von Hühnern, Apparat.	192	Ei von Argas persicus.	201
Bindehaut, Epithelzellen. (Taf., Fig. 1 bis 3.)	39	Epithelzellen der Bindehaut. (Taf., Fig. 1 bis 3.)	39
		Fasciolopsis Füllebornii n. sp., Anatomie. (Taf.)	453. 461
		Flüssigkeitsmengen, kleinste, Apparat zur Abmessung, Mischung und Injektion.	492
		Harnsediment bei Cystitis.	170
		Heterakis poculum n. sp., Schwanzende.	449

<i>Heterakis</i> Schebeni, n. sp., Schwanzende.	448	<i>Spirochaete</i> obermeieri, Kern.	347
Hirn, Veränderungen bei Cholera.	301	— —, Teilung.	347
Hornhaut, Inokulation mit varicellösem		— plicatilis, Bauschema. (Taf., Fig. 8a).	447
Material, Schnitt. (Taf.)	189	<i>Spirochaeten</i> , Hühner-.	194
Huhn, Befestigungsapparat für dasselbe.	192	<i>Spirochätose</i> der Hühner.	193
Huhn, <i>Spirochätose</i> .	193	— der Hühner, Blutpräparat.	194
Injektion kleinster Flüssigkeitsmengen.	492	<i>Streptococcus pyogenes</i> , Morphologie.	564
Kala-Azar, Blutpräparat. (Taf.)	426		565. 567
Keuchhusten-Bacillus s. Bacillus, Keuch-		Trachom, Tränensackbekleidungszellen.	
husten-.		(Taf., Fig. 4, 5.)	39
<i>Leishmania donovani</i> . (Taf.)	426	Tränensackbekleidungszellen bei Trachom.	
Maul- und Klauenseuche, mikroskopische		(Taf., Fig. 4, 5.)	39
Untersuchungen. (Taf. III.)	35	<i>Trypanosoma brucei</i> , Formveränderungen.	
Methämoglobin, Spektrum.	259	(Taf.)	611
Mischung kleinster Flüssigkeitsmengen,		<i>Typhus exanthematicus</i> , Protozoonfund.	
Apparat.	492	(Taf.)	614
<i>Oxyuris polyoon</i> n. sp., Schwanzende.	450	Ultramikroskopie, Apparat.	284. 286
<i>Physaloptera brevicauda</i> n. sp., Schwanz-		<i>Vaccine</i> , mikroskopische Untersuchung.	
ende.	450	(Taf. I, II.)	35
Pipette für Bakterienzüchtung und Serum-		— -Körperchen. (Taf. I, II.)	35
diagnostik.	646	<i>Varicella</i> , Hornhautinokulation, Schnitt.	
Protozoon bei <i>Typhus exanthematicus</i> .		(Taf.)	189
(Taf.)	614	—, mikroskopische Untersuchung. (Taf.)	189
Rückenmark, Veränderungen bei Cholera.	300	<i>Variola</i> -Körperchen. (Taf. I, II.)	35
<i>Sarcina mucosa</i> , Kultur.	291	—, mikroskopische Untersuchung. (Taf. I,	
— —, Phagozytose.	291	II.)	35
Sediment, Harn- bei Cystitis.	170	<i>Vibrio cholerae</i> im Hirn bei Cholera.	301
Serumdiagnostik, Pipette für dieselbe.	646	— — im Rückenmark bei Cholera.	300
<i>Spirochaete flexibilis</i> n. sp. (Taf.)	447		

st.

st.

